



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LORENA SOUZA RITTBERG MAURICIO

**Efeitos do Tratamento com L-Arginina sobre a Inflamação em
células MDA-MB-231 de Câncer de Mama Triplo Negativo**

VITÓRIA-ES

2025

LORENA SOUZA RITTBERG MAURICIO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-ARGININA SOBRE A
INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS MDA-MB-231 DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Sonia Alves Gouvea

VITÓRIA-ES

2025

LORENA SOUZA RITTBERG MAURICIO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM L-ARGININA SOBRE A
INFLAMAÇÃO EM CÉLULAS MDA-MB-231 DE CÂNCER DE MAMA
TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito p para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 21 de março de 2025.

Prof. Dr^a Sônia Alves Gouvea (Orientadora)

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

Prof. Dr^a Girlandia Alexandre Brasil Amorim (Banca externa)

Universidade Vila Velha – UVV

Prof. Dr^a Flávia Imbroisi Errera (Banca interna)

Universidade Federal do Espírito Santo – UFES

VITÓRIA, ES

2025

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

S719e Souza Rittberg Mauricio, Lorena, 2001-
Efeitos do tratamento com L-arginina sobre a inflamação em
células MDA-MB-231 de câncer de mama triplo negativo. /
Lorena Souza Rittberg Mauricio. - 2025.
67 f. : il.

Orientadora: Sonia Alves Gouvea.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Câncer de Mama triplo negativo. 2. Inflamação. 3. Células
MDA-MB-231. 4. Via Nrf2. 5. Via NF-kB. I. Alves Gouvea,
Sonia. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de
Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Ata da 241ª sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **Lorena Souza Rittberg Mauricio**, realizada às catorze horas do dia vinte e um de março de dois mil e vinte e cinco. A sessão pública foi realizada em formato presencial, no auditório do PPGBiotec. A presidente da Banca, Profª Drª Sônia Alves Gouvea (orientadora), apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Flávia Imbroisi Valle Errera, examinador interno; Girlandia Alexandre Brasil Amorim, examinador externo. Em seguida, passou a palavra à aluna que apresentou a sua proposta de dissertação intitulada **“Efeitos do tratamento com L-arginina sobre a inflamação em células MDA-MB-231 de câncer de mama triplo negativo”**. Terminada a apresentação, a presidente retomou a palavra e a cedeu aos membros da Comissão Examinadora, um a um, para procederem à arguição. Em seguida, a presidente convidou a Comissão Examinadora a se reunir em separado para deliberação. Ao final, a Comissão Examinadora retornou e a presidente informou aos presentes que a Dissertação havia sido **APROVADA**. A Presidente, então, deu por encerrada a sessão, e lavrou a presente ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 21 de março de 2025.

Sônia Alves Gouvea
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientadora

Flávia Imbroisi Valle Errera
Universidade Federal do Espírito Santo - Examinador interno

Girlandia Alexandre Brasil Amorim
Universidade Vila Velha (UVV) - Examinador externo ao Programa





UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

PROTOCOLO DE ASSINATURA



O documento acima foi assinado digitalmente com senha eletrônica através do Protocolo Web, conforme Portaria UFES nº 1.269 de 30/08/2018, por
SONIA ALVES GOUVEA - SIAPE 1671557
Departamento de Ciências Fisiológicas - DCFI/CCS
Em 03/04/2025 às 11:37

Para verificar as assinaturas e visualizar o documento original acesse o link: <https://api-lepisma.prod.uks.ufes.br/arquivos-assinados/1108539?tipoArquivo=O>



Documento assinado digitalmente

FLAVIA IMBROSI VALLE ERRERA

Data: 03/04/2025 16:38:38-0300

verifique em <https://validar.iti.gov.br>



Documento assinado digitalmente

GIRLANDIA ALEXANDRE BRASIL AMORIM

Data: 03/04/2025 16:57:28-0300

verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e por terem renunciado à; muitas coisas em prol das realizações de seus filhos.

E á mim, pelo esforço e por nunca desistir dos meus sonhos – mesmo quando a loucura parecia inevitável.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela dádiva da vida e por ter me sustentado e amparado até aqui. Sem Ele, eu não conseguiria.

Agradeço aos meus pais, Crismaura e Juarez, minha base inabalável, por todo amor, apoio e pelos inúmeros sacrifícios feitos – não foram poucos – para que eu pudesse trilhar este caminho. Obrigada por acreditarem em mim, mesmo quando nem eu mesma acreditei, e por me ensinarem o verdadeiro significado da dedicação, perseverança, bondade e amor. Sem vocês, nada disso seria possível.

Ao meu irmão, Rittberg (Didi), por ser O irmão, sempre cuidando, me protegendo e me incentivando, além de oferecer seus conselhos quando eu estava a ponto de desistir – mesmo que esse conselho fosse um copo de cerveja todo final de semana com um churrasco.

Agradeço à minha tia (segunda mãe), Crislaura, e à minha prima-irmã, Jhessica, por cuidarem e acreditarem em mim. Os momentos com vocês trazem sempre boas lembranças. Ao meu sobrinho Heitor, que, sem saber, já me ajudou e me fez muito feliz nesses quatro aninhos de vida.

À minha querida orientadora, Sônia Alves Gouvea, por ter aberto as portas do laboratório para mim com tanto carinho, por sua paciência, ensinamentos e orientação, que foram fundamentais para o desenvolvimento desse trabalho. Não poderia esquecer das viagens e passeios. Sua dedicação a ciência e ao ensino servem de inspiração para mim. Você é uma grande orientadora e amiga.

Ao meu co-orientador, que virou um grande amigo, Vinicius Mengal, por sempre me auxiliar nessa caminhada e me ouvir quando precisei. Suas broncas (que não foram poucas) e conselhos foram essenciais nessa trajetória. Você é uma pessoa incrível e cheia de luz, tenho um carinho enorme por você. Obrigada!

Agradeço às minhas amigas, Thais Paz, Luana Silva, Juliana Bourguignon, Cassia Pimenta, Thayna Vargas e Eduarda Azevedo por sempre vibrarem em cada uma das minhas conquistas – o mestrado foi uma delas. Em especial à minha amiga Larah Peçanha, por ter aguentando meus surtos e loucuras falando que ia largar tudo para vender abacaxi em Marataízes e, gentilmente, mandava eu dormir que iria passar. Agradeço também a minha cachorrinha Maya Maria, que sem entender nada me alegra todos os dias. Vocês são essenciais em minha vida

Agradeço às minhas amigas Bárbara Risse e Marcele Lorenzits por me ajudarem no processo de ingresso no mestrado.

Agradeço aos amigos que fiz ao longo desse mestrado, em especial Matheus Casotti, Gabrielle Feu e meu amigo João Augusto Diniz – que me abandonou – mas também me ajudou muito nesses dois anos e fez com que essa caminhada se tornasse menos pesadas (pois dividíamos os esporros haha). Agradeço também a Bárbara Caetano, uma amiga da graduação que logo se tornou amiga de mestrado. Muito obrigada, vocês tiveram grande participação na minha trajetória.

Aos membros da banca examinadora, Prof^aDr.^a Girlândia Alexandre Brasil Amorim e Prof^aDr.^a Flávia Imbroisi Errera, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação. Vocês são demais!

Agradeço aos laboratórios parceiros, LUCCAR e LABIOM, por ceder alguns equipamentos para a realização da presente pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia pela oportunidade e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) pela bolsa concedida para a realização deste mestrado.

Á todos vocês, meus sinceros obrigada!

EPÍGRAFE

“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário”. (Albert Einstein)

RESUMO

MAURICIO, L.S.R. **Efeitos do Tratamento com L-arginina sobre a Inflamação em células MDA-MB-231 de Câncer de Mama Triplo Negativo.** 2025. 67f. Dissertação Mestrado em Biotecnologia – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é uma forma agressiva de câncer de mama, sem receptores hormonais ou HER2, o que limita as opções terapêuticas e piora o prognóstico. Diante da escassez de alvos terapêuticos, a busca por estratégias que influenciem os mecanismos celulares envolvidos na progressão tumoral têm sido investigadas. Nesse contexto, a L-arginina, um aminoácido condicionalmente essencial, tem se destacado por seu potencial em regular a inflamação e o metabolismo tumoral, o que pode, por sua vez, influenciar positivamente a resposta ao tratamento. O objetivo principal é avaliar os efeitos da L-arginina na viabilidade celular e vias relacionadas com inflamação em células MDA-MB-231. Células da linhagem MDA-MB-231 foram submetidas a diferentes concentrações de L-arginina (800ug/ml; 1600ug/ml; e 3200ug/ml) por 48h. O ensaio AlamarBlue® foi utilizado para medir a proliferação e avaliar a viabilidade celular. Para avaliar a expressão de Nrf2 e NF- κ B, foi realizado o método de Western Blot e as citocinas inflamatórias foram quantificadas por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que a L-arginina diminuiu a viabilidade celular das células MDA MB 231 em concentrações mais altas de 1600ug/ml; e 3200ug/ml houve aumento da expressão de Nrf2 e NF- κ B, que podem ativar a via da ferroptose; aumento dos níveis de citocinas como IL-17A, IL-6, IL-2 e IFN- γ ; diminuição de IL-10 e não houve alterações significativas entre os grupos IL-4 e TNF- α . Esses achados sugerem que a L-arginina tem potencial como estratégia terapêutica no câncer de mama, especialmente no contexto de tumores agressivos como o TNBC.

Palavras-chave: TNBC; Nrf2; Nfkb; Apoptose.

EFFECTS OF L-ARGININE TREATMENT ON INFLAMMATION IN MDA-MB-231 TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER CELLS

ABSTRACT

MAURICIO, L.S.R. Effects of L-arginine Treatment on Inflammation in MDA-MB-231 Triple Negative Breast Cancer Cells. 2025. 67f. Master's Dissertation in Biotechnology – Postgraduate Program in Biotechnology, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Triple-negative breast cancer (TNBC) is an aggressive form of breast cancer lacking hormone receptors or HER2, which limits therapeutic options and worsens prognosis. Given the scarcity of therapeutic targets, the search for strategies that influence the cellular mechanisms involved in tumor progression has been investigated. In this context, L-arginine, a conditionally essential amino acid, has stood out for its potential to regulate inflammation and tumor metabolism, which may, in turn, positively influence the response to treatment. The main objective is to evaluate the effects of L-arginine on cell viability and inflammation-related pathways in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells were subjected to different concentrations of L-arginine (800ug/ml; 1600ug/ml; and 3200ug/ml) for 48h. The AlamarBlue® assay was used to measure proliferation and evaluate cell viability. To evaluate the expression of Nrf2 and NF-kB, the Western Blot method was performed and inflammatory cytokines were quantified by flow cytometry. The results showed that L-arginine decreased the cell viability of MDA MB 231 cells at higher concentrations of 1600ug/ml; and 3200ug/ml there was an increase in the expression of Nrf2 and NF-kb, which can activate the ferroptosis pathway; increased levels of cytokines such as IL-17A, IL-6, IL-2 and IFN- γ ; decreased IL-10 and there were no significant changes between the IL-4 and TNF- α groups. These findings suggest that L-arginine has potential as a therapeutic strategy in breast cancer, especially in the context of aggressive tumors such as TNBC.

Key words: TNBC; Nrf2; Nfkb; Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias Canônicas e não canônicas.	25
Figura 2. Estrutura do fator de transcrição Nrf2 humano e a atividade associada a cada domínio.	27
Figura 3. Regulação Negativa do Nrf2 em condições normais e ativação em condições patológicas.	28
Figura 4. Biossíntese natural de L-arginina.	31
Figura 5. Placa da Proliferação e Viabilidade Celular.	36
Figura 6. Efeitos do tratamento com L-arginina em diferentes concentrações sobre a viabilidade celular.	41
Figura 7. Área sob a curva (AUC).	42
Figura 8. Efeitos do tratamento de L-arginina em diferentes concentrações sobre a expressão proteica de Nrf2 e NFkB em células MDA-MB-231.	43
Figura 9. Efeitos do tratamento de L-arginina em diferentes concentrações sobre as citocinas IL17A, IL-10, IL-6, IL-4 e IL-2.	44
Figura 10. Efeitos do tratamento de L-arginina em diferentes concentrações sobre as citocinas INF- γ e TNF- α	45
Figura 11. Efeitos do tratamento com L-arginina em diferentes concentrações sobre os níveis de AOPP de células MDA-MB-231.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ l – Microlitro

μ M – Micromolar

μ g – Micrograma

mL – Mililitro

BRCA1 – proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 1 (do inglês Breast cancer type 1 susceptibility protein)

BRCA2 – proteína de suscetibilidade ao câncer de mama tipo 2 (do inglês Breast cancer type 2 susceptibility protein)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês DesoxyriboNucleic Acid)

NOS – Óxido nítrico sintase

eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal

ER – Receptor de estrogênio

PR – Receptor de progesterone

HER2 - Fator de crescimento epidérmico humano

ERNs – Espécies reativas de nitrogênio

EROs – Espécies reativas de oxigênio

L-ARG – L-arginina

MDA-MB-231 – MD Anderson - Metastatic Breast – 231

MT – Microambiente Tumoral

NO – Óxido nítrico

NRF2 – Fator Nuclear derivado Eritróide 2 (do inglês Nuclear factor erythroid 2-related factor 2)

NF-kB – Fator Nuclear Kappa B (do inglês Nuclear factor kappa-B)

PIK3CA - Subunidade catalítica alfa da fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase

PTEN - Homólogo de fosfatase e TENsina deletado no cromossomo

TAMs – Macrófagos associados a Tumor

TNBC – Câncer de Mama Triplo Negativo (Tripe Negative Breast Cancer)

INCA – Instituto Nacional do Câncer

PARP – Poli (ADP – ribose) polimerase (do inglês poly (ADP-ribose) polymerase)

EGFR – Receptor do Fator de crescimento epidérmico (do inglês epidermal growth factor receptor)

ARE – Elemento de Resposta Antioxidante

HMOX- 1 – Heme oxigenase 1

ASS1 – Enzima argininosuccinato sintase

ASL – Enzima argininosuccinato liase

FMN – Flavina mononucleotídeo

FAD – Flavina adenine dinucleotídeo

KEAP1 – Proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (do inglês Kelch-like ECH-associated protein 1)

sMAF – Fibrossarcoma masculoaponeurótico (do inglês musculoaponeurotic fibrosarcoma)

DMEs – Enzimas metabolizadoras de fármacos

GST – Glutathione S-transferase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO	18
2.2 LINHAGEM MDA-MB-231.....	22
2.3 INFAMAÇÃO E CÂNCER – VIA NF-Kb	23
2.4 VIA NRF2	26
2.5 L-ARGININA	30
3 OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL.....	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	35
4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS	35
4.3 PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	36
4.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA	37
4.4.1 WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS	37
4.4.2 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	37
4.4.3 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE)	38
4.4.4 TRANSFERÊNCIA DE PROTEÍNAS	38
4.4.5 INCUBAÇÃO DOS ANTICORPOS	38
4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	39
4.6 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEÍCA.....	39
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
5 RESULTADOS	41
5.1 VIABILIDADE CELULAR E CAPACIDADE PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS MDA-MB-231	41
5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEÍCA	42
5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NAS CÉLULAS MDA-MB- 231	43

5.4 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA	
.....	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é uma doença multifatorial, que se manifesta nos ductos e glândulas mamárias (Feng et al., 2018), e abrange um grupo heterogêneo de tumores que podem apresentar variações clínicas, morfológicas, moleculares, biológicas e diferentes respostas ao tratamento (Rakha; Tse; Quinn, 2023).

Apesar dos avanços nas pesquisas e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para as neoplasias mamárias, as taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil continuam a crescer (INCA, 2023). O câncer de mama triplo negativo (TNBC), que corresponde a uma parcela significativa dos casos, apresenta um desafio terapêutico devido à ausência de receptores hormonais, limitando as opções de tratamento (Yin *et al.*, 2020). Diante desse cenário, é fundamental compreender melhor os mecanismos envolvidos na incidência, progressão e terapêutica da doença.

Estudos revelam que as vias de sinalização tumorigênicas não são suficientes para uma progressão completa do câncer de mama, sugerindo a contribuição de outros fatores, incluindo principalmente, o microambiente inflamatório do tumor (You *et al.*, 2023; Goenka *et al.*, 2023; Greten; Grivennikov, 2020). Os sistemas imunológicos, inato e adquirido, são mecanismos importantes que desempenham um papel crítico nas respostas à tumorigênese, e o efeito do sistema imunológico e dos fatores inflamatórios nas células tumorais, especialmente nas células do câncer de mama. A inflamação é uma resposta do sistema imunológico a estímulos externos ou internos que removem o agressor e restauram a fisiologia do corpo. No entanto, em estados patológicos a inflamação crônica pode ser um grande modulador e precursor de diversas doenças (Ben-Baruch, 2003).

Evidências emergentes apoiam a relação entre o câncer de mama e a inflamação. Células imunes específicas residem permanentemente no tecido mamário, como os macrófagos (Field, 2005). Os macrófagos ajudam no desenvolvimento e remodelação da glândula mamária (Reed; Schertfeger, 2010; Ingman *et al.*, 2006). A tumorigênese mamária é semelhante à remodelação do tecido. A desregulação do equilíbrio entre as células que residem no tecido, e as que

migram por fatores diversos, pode levar ao estado de inflamação crônica (Pollard, 2009); no entanto, as causas e os mecanismos ainda não estão bem estabelecidos.

A ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B e Nrf2, são componentes-chave das cascatas de sinalização de inflamação e respostas ao estresse oxidativo (Kaulmann; Bohn, 2014). Evidências recentes indicam que o fator de transcrição Nrf2 desempenha um papel fundamental no controle da expressão de genes antioxidantes e, também, exercem funções anti-inflamatórias. A conexão entre o sistema Nrf2/elemento de resposta antioxidante (ARE) e a expressão de mediadores inflamatórios, via NF- κ B e o metabolismo de macrófagos está intimamente relacionado a diferentes doenças, incluindo o câncer de mama (Saha *et al.*, 2020).

Atualmente, os CM são classificados em subtipos: Luminal A (ER+PR \geq 20%, HER2-, Ki67 < 20%), Luminal B (ER+, PR < 20% e/ou HER2+ e/ou Ki67 \geq 20%), HER2 (ER-, PR-, HER2+) e basal (triplo negativo: ER-, PR-, HER2-) (Parker *et al.*, 2009; Kudela *et al.*, 2020; Derakhshan; Filho, 2022). Dentre esses subtipos, o TNBC é um subtipo distinto de câncer de mama responsável por aproximadamente 10% a 20% dos casos (Fan; He, 2022). Quando comparado a outros subtipos, o TNBC apresenta uma taxa de recorrência mais alta, metástases precoces e menor taxa de sobrevida (Furukawa *et al.*, 2024). Essa agressividade está associada à instabilidade genômica, heterogeneidade intratumoral e à plasticidade celular (Blaszczak *et al.*, 2025).

Por não expressar ER), PR e HER2, existem poucas opções de tratamentos para o TNBC (Li *et al.*, 2022). Dessa forma, o tratamento mais comum e eficaz, não cirúrgico, envolve quimioterapia a qual inclui antraciclinas, agentes alquilantes e taxanos (Won; Spruck, 2020). Contudo, dada a limitação das opções terapêuticas disponíveis e a resistência frequentemente observada aos tratamentos convencionais, novas estratégias terapêuticas estão sendo investigadas. Uma dessas abordagens é o uso de substâncias que modulam o microambiente tumoral, como a L-arginina (L-arg) (Yao *et al.*, 2025)

A L-arg, um aminoácido condicionalmente essencial, desempenha papel crucial em vias metabólicas como a síntese de óxido nítrico (NO) por meio da ação

das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Mirini; Agarwal; Didelija, 2015; Kumar; Singh; Bhardwaj, 2017). O NO é uma molécula sinalizadora que modula diversas vias biológicas, incluindo a resposta imune, inflamação e homeostase celular. Estudos preliminares sugerem que a L-arginina pode modular o microambiente tumoral, influenciando a inflamação e a resistência terapêutica (Pourbagher *et al.*, 2021). Considerando as características da L-arg e as limitações terapêuticas no tratamento do TNBC, levantamos a hipótese de que a L-arg contribui para a morte de células tumorais.

Neste contexto, o presente estudo busca investigar os efeitos do tratamento com L-arginina sobre a inflamação em uma linhagem de TNBC (MDA-MB-231). Assim, uma questão central a ser investigada é: de que forma a L-arginina age sobre a viabilidade celular em células TNBC, e quais mecanismos podem ser explorados para aumentar a eficácia do tratamento?

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

O câncer de mama triplo negativo (TNBC) é caracterizado pela ausência de marcadores tumorais como: receptor de estrogênio, receptor de progesterona e receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (Sukumar *et al.*, 2021). Em decorrência dessas características moleculares, os TNBCs não respondem a terapias endócrinas ou direcionadas a HER2, sendo o tratamento mais eficaz, não cirúrgico, a quimioterapia não específica padrão, como taxanos e antraciclinas (Li *et al.*, 2022). Entretanto, esse subtipo apresenta alta taxa de proliferação celular, comportamento metastático precoce e resistência ao tratamento, fatores que resultam em uma pior sobrevida global quando comparado a outros subtipos de cancer de mama (Furukawa *et al.*, 2024)

Lehmann e colaboradores (2011), inicialmente, identificaram seis subtipos diferentes de TNBC baseado em análise de expressão gênica, cada um associado às características biológicas específicas: basal-like 1 (BL1); basal-like 2 (BL2); imunomodulador (IM); mesenquimal (M); mesenquimal stem-like (MSL) e receptor de andrógeno luminal (LAR). No entanto, em um estudo posterior, os mesmos autores refinaram essa classificação para quatro subtipos principais (BL1; BL2, M e LAR), ao perceberem que os subtipos IM e MSL correspondiam a presença de linfócitos infiltrantes substanciais e células mesenquimais associadas ao tumor, respectivamente, e não a grupos tumorais biologicamente distintos (Lehmann *et al.*, 2016) (Tabela 1).

Tabela 1: Características dos diferentes subtipos de TNBC

Subtipo Tumoral	Características	Linhagens Celulares
Basal-Like (BL1)	1 Expressão de genes relacionados ao ciclo celular, proliferação e reparo do DNA (via ATR-BRCA).	HCC2157 HCC1599 HCC1937 HCC1143 HCC3153 MDA-MB-468 HCC38
Basal-Like (BL2)	2 Vias de sinalização relacionados a fatores de crescimento (EGFR, MET, NGF wnt, IGF-1R), glicólise e gliconeogênese.	SOMA149PT CAL-851 HCC70 HCC1806 HDQ-P1
Mesenquimal (M)	Alta motilidade e taxa de diferenciação celular, transição epitélio-mesenquimal (EMT), sinalização de fatores de crescimento e genes da angiogênese.	BT-549 MDA-MB-157 SUM159PT MDA-MB-436 MDA-MB-231 HS578T

Andrógeno luminal (LAR)	Padrão de expressão gênica luminal, superexpressão do receptor de andrógeno, subtipo molecular apócrino.	MDA-MB-453
		SOMA185PE
		HCC2185
		CAL-148
		MFM-223

Fonte: Adaptado de Yin *et al.* (2020).

Essa classificação molecular é relevante para a identificação de potenciais alvos terapêuticos, uma vez que cada subtipo apresenta características distintas de crescimento e resposta ao tratamento (Lehmann *et al.*, 2016). O subtipo BL-1, por exemplo, exibe alta atividade de vias envolvidas na reparação de danos ao DNA e pode ser mais sensível a inibidores de polimerase (PARP). Já o BL-2 apresenta ativação anormal de vias de sinalização, incluindo EGFR, MET, NGF, Wnt/ β -catenina e IGF-1R (Yin *et al.*, 2020). O subtipo M é caracterizado pela ativação de vias de sinalização associadas à migração celular, interação com a matriz extracelular e vias de diferenciação, como por exemplo via Wnt, via cinase do linfoma anaplásico (ALK) e sinalização de crescimento transformador (TGF)- β . Esse perfil molecular confere ao subtipo M propriedades similares às de tecidos de sarcomas ou células epiteliais escamosas, além de resistência a quimioterápicos. Por fim, o subtipo LAR exibe dependência de andrógenos, apesar de não expressar receptor de estrogênio (ER) (Lehmann; Pietenpol, 2014).

Os TNBCs, como um grupo, apresentam comportamento clínico agressivo (Derakhshan; Reis, 2022). Essa agressividade está relacionada a características biológicas distintas, incluindo alta taxa de proliferação celular, instabilidade genômica, incluindo mutações em *TP53* e *BRCA1* e *BRCA2*, ausência de marcadores tumorais e microambiente tumoral imunossupressor (Benchama *et al.*, 2022). Além dessas alterações, mutações em genes como *PIK3CA*, *PTEN* e *RB1* também são frequentemente observadas, afetando vias relacionadas à sobrevivência celular, metabolismo energético e à resposta ao estresse oxidativo (Zhao *et al.*, 2020).

O microambiente tumoral também desempenha importante papel na progressão, resistência terapêutica e modulação da resposta inflamatória no TNBC (Zheng *et al.*, 2021). Esse microambiente é caracterizado por uma interação dinâmica e altamente regulada entre células tumorais, células imunes infiltrantes, componentes da matriz extracelular, macrófagos associados ao tumor e mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (Guo *et al.*, 2024). A infiltração de macrófagos associados a tumor (TAMs), predominantemente o macrófago M2, contribui para a evasão imunológica e favorece um perfil pró-tumoral por meio da secreção de fatores imunossupressores e pró-angiogênicos (Ruizhe; Kang; Chen, 2024; Vitale *et al.*, 2019).

O metabolismo tumoral no TNBC é outro fator crucial que impulsiona a sua agressividade. Esse subtipo de câncer frequentemente apresenta reprogramação metabólica, com aumento da glicólise aeróbica, mesmo na presença de oxigênio (efeito Warburg), para sustentar a proliferação, metástase e escape imunológico (Liu *et al.*, 2023).

Outro mecanismo recorrente no TNBC é a ativação de vias críticas como PI3K/AKT/mTOR, essa via relaciona a sinalização da tirosina quinase do receptor (RTK) ao crescimento celular e à regulação da sobrevivência, promovendo o aumento da proliferação, inibição da apoptose formando tumores e promovendo metastase (Zhang *et al.*, 2024). Outra via ativada nesse subtipo de tumor é a NF- κ B, que está relacionada à inflamação crônica, resistência ao tratamento e à expressão de genes anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Mcl-1, que ajudam as células tumorais a evadir a morte celular programada (Ferrari *et al.*, 2022). Além disso, a via Nrf2, que regula a resposta antioxidante, também está frequentemente ativada no TNBC devido à desregulação do gene KEAP1.

Diante de suas características biológicas complexas, novas estratégias terapêuticas têm sido investigadas para melhorar a resposta ao tratamento do TNBC. Entre essas abordagens, destacam-se os inibidores de checkpoint imunológico, como anti PD-1/PD-L1, que têm como objetivo reverter a imunossupressão mediada pelo microambiente tumoral (Bullock; Richmond, 2024). Além disso, terapias direcionada a vias de reparo do DNA, como inibidores de

PARP, mostram eficácia em pacientes com mutações em BRCA1 e BRCA2 (Jain; Barge; Parris, 2024).

Embora essas terapias direcionadas tenham demonstrado benefícios significativos, nem todos os pacientes respondem de maneira significativa (Furukawa *et al.*, 2023), sendo necessário novas abordagens. Nesse contexto a L-arginina tem se destacado como uma alternativa promissora devido seu papel na síntese de óxido nítrico (Martí; Reith, 2021)

Para investigar os efeitos de abordagens terapêuticas e mecanismos envolvidos no TNBC, modelos celulares são amplamente utilizados. Dentre esses modelos, a linhagem celular MDA-MB-231 se desta no campo científico por possuir características compatíveis com o fenótipo agressivo do TNBC, incluindo alta capacidade proliferativa (Sukumar *et al.*, 2021).

2.2 LINHAGEM MDA-MB-231

A MDA-MB-231 é uma linhagem celular humana derivada de um adenocarcinoma mamário triplo negativo, isolada a partir de uma metástase pleural de uma paciente caucasiana de 51 anos (BCRJ, 2022). A amostra foi coletada em 17 de outubro de 1973, após a paciente ter sido submetida a uma mastectomia radical na mama direita, e posteriormente estabilizada em laboratório (Cailleau *et al.*, 1974). As células MDA-MB-231 são caracterizadas pela ausência de expressão dos receptores de ER, PR e HER2, o que as torna resistentes a terapias hormonais e a tratamentos direcionados contra o HER (Sukumar *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022).

Do ponto de vista genético, a MDA-MB-231 apresenta um cariótipo aneuploide, com múltiplas alterações cromossômicas, contribuindo para sua heterogeneidade celular (Yoon *et al.*, 2002).

Outro fator de destaque na biologia dessa linhagem é sua relação com o metabolismo do ferro. As células MDA-MB-231 apresentam uma regulação alterada da homeostase do íon ferro, caracterizada por uma maior captação de ferro (Wang *et al.*, 2022), e menor expressão de ferroportina, a principal proteína envolvida na exportação de ferro celular (Pinnix *et al.*, 2010). Esse acúmulo intracelular de ferro

está associado ao aumento da proliferação celular e ao estresse oxidativo, fatores que contribuem para o crescimento e progressão tumoral (Arzuk; Armagan, 2024). No entanto, quando o acúmulo de ferro é excessivo e supera a capacidade antioxidante da célula, pode desencadear a ferroptose, processo que ocorre devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio e à peroxidação lipídica descontrolada, levando à disfunção da membrana celular e morte (Guo *et al.*, 2021).

Diante dessas características, a linhagem MDA-MB-231 é amplamente utilizada como modelo experimental em estudos sobre o subtipo de câncer de mama triplo negativo (Wagner, 2022). Seu perfil altamente invasivo e agressividade a torna relevante em pesquisa sobre migração, invasão e metástase, contribuindo para a busca de terapias mais eficazes para esse subtipo de câncer.

2.3 INFLAMAÇÃO E CÂNCER – VIA NF-Kb

A relação entre inflamação e câncer vem sendo discutida há muito tempo (Bryant, 1868; Nardo; Coussens, 2007; Danforth, 2021). Em 1863, Rudolf Virchow propôs à associação entre inflamação crônica e a carcinogênese ao observar a presença de leucócitos infiltrados em tecidos neoplásicos (Balkwill; Mantovani, 2001). Evidências subsequentes demonstraram que o microambiente inflamatório modula múltiplas etapas da tumorigênese, influenciando a proliferação celular, sobrevivência e angiogênese. Na atualização dos *Hallmarks of Cancer*, Hanahan e Weinberg (2011), consolidaram a inflamação crônica como um componente essencial do fenótipo tumoral, contribuindo não apenas para a progressão neoplásica, mas também como um fator chave para a resistência terapêutica.

A inflamação é definida como uma resposta biológica que protege o hospedeiro contra estímulos lesivos, como infecções e danos teciduais, com a finalidade de impedir a disseminação de patógenos e promover o reparo dos tecidos (Varela *et al.*, 2018). No contexto do câncer, porém, essa resposta pode ser desregulada, favorecendo a progressão tumoral e a evasão imunológica. Em nível molecular, a inflamação crônica está envolvida na imunossupressão do microambiente tumoral, fornecendo um microambiente favorável à tumorigênese, ao crescimento e à metástase (Wang; DuBois, 2015). Enquanto a inflamação aguda

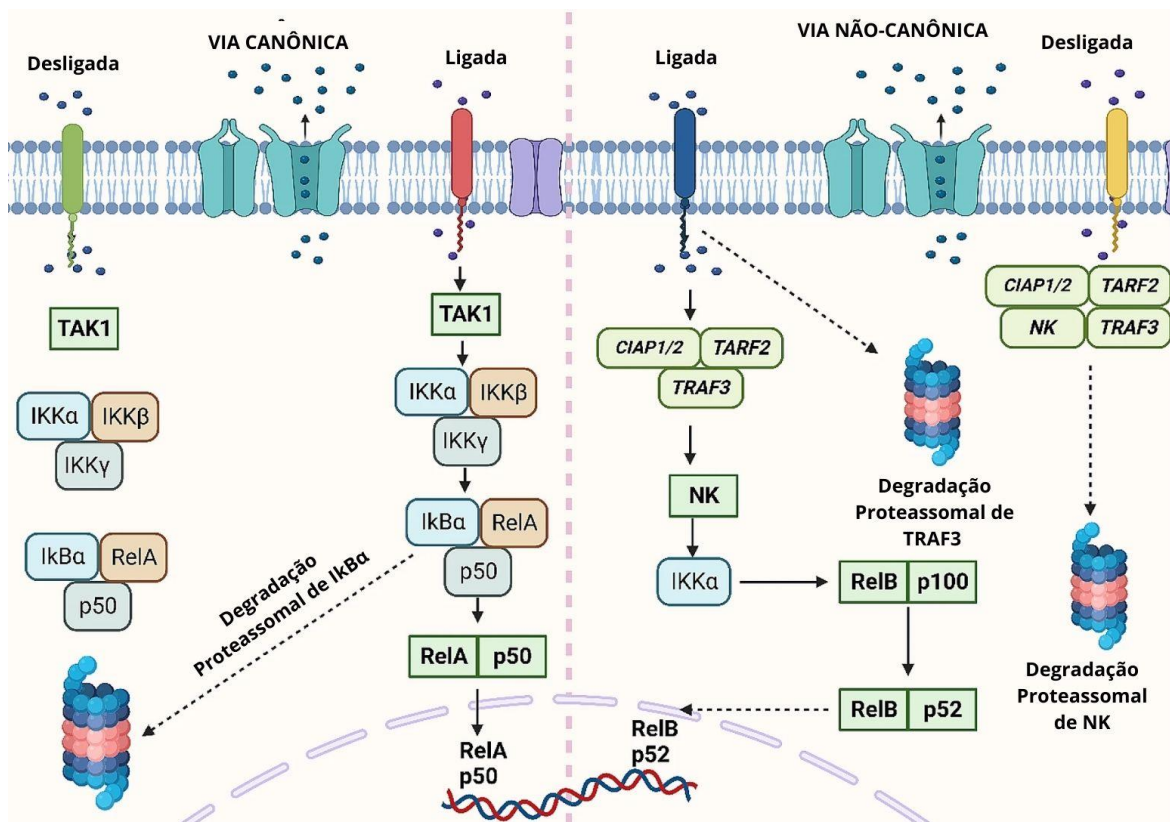
contribui para uma resposta imune antitumoral, resultando na morte das células cancerígenas (Yi *et al.*, 2024). Os efeitos pró-tumorais da inflamação crônica são mediados por uma complexa rede de citocinas, quimiocinas e células do sistema imunológico, que modulam o microambiente tumoral e estabelece um estado inflamatório persistente associado ao tumor, influenciando a progressão da doença (Wang *et al.*, 2024). No microambiente tumoral, a resposta inflamatória é sustentada por uma complexa interação entre células do sistema imunológico e células cancerígenas (Wang *et al.*, 2024). Os macrófagos associados a tumores representam um dos principais componentes celulares da inflamação tumoral, podendo assumir um fenótipo M1, com função antitumoral, ou M2, que promove a imunossupressão e o crescimento neoplásico (Pan *et al.*, 2021).

Dentre os mediadores inflamatórios, as citocinas desempenham um papel central na comunicação celular e na modulação do microambiente tumoral. No processo inflamatório, as citocinas são as principais moléculas de sinalização liberadas no local e possuem múltiplas funções. Elas são classificadas em pró-inflamatórias (IL-6, IL-17, TNF- α , e IFN- γ), e anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10), que exercem funções imunossupressoras, contribuindo para a evasão do sistema (Zhao *et al.*, 2021).

Os mediadores inflamatórios e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e oxigênio (EROs) podem induzir a ativação de vias como a do Fator Nuclear Kappa B (NF- κ B), facilitando a tumorigênese mediada pela inflamação (Benchama *et al.*, 2022). O NF- κ B é um fator de transcrição crucial para a regulação da resposta inflamatória e da homeostase redox (Gao *et al.*, 2022), controlando a expressão de genes antioxidantes e pró-oxidantes que modulam a sensibilidade celular ao estresse oxidativo e a ferroptose (Lingappan, 2018; Li *et al.*, 2021).

NF- κ B é formado a partir de homo e heterodímeros de cinco proteínas distintas relacionadas: proteínas da subfamília REL p65/RelA, RelB e c-Rel e as proteínas da subfamília NF- κ B, p50 (NF- κ B1) e p52 (NF- κ B2), e seus precursores p105 e p100, respectivamente (Sun; Chang; Jin, 2014). A ativação do NF- κ B envolve duas vias de sinalização principais, as vias canônicas e não canônicas (ou alternativas) (Sol, 2012) (Figura 1).

Figura 1: Vias Canônicas e não canônicas



Fonte: Adaptado de Ma e colaboradores (2024)

Na via canônica, o evento molecular determinante é a fosforilação da proteína IκB mediada por IKKs, que são compostas pelas subunidades IKKα e IKKβ, subunidades enzimáticas, e IKKγ (ou NEMO), que atua como uma subunidade reguladora (Liu et al., 2017). O IKK pode ser ativado por vários estímulos, incluindo receptores pró-inflamatórios, como a superfamília TNF, a família do receptor Toll – Like (TLRs), bem como por citocinas, fatores de estresse e componentes microbianos (Morgan; Liu, 2010). Após ativação, os IKKs fosforilam os IκBs, que por sua vez são reconhecidas e marcadas pela ubiquitina ligase e degradadas pelo proteossoma. Como resultado ocorre a dissociação do NF-κB e translocação nuclear, principalmente os dímeros RelA/p50 e c-Rel/p50 (Wang; Nag; Zhang, 2014; Zhang; Sun, 2015). A ativação da via não canônica do NF-κB ocorre de forma independente do complexo IKK e da degradação da proteína IκBα. Esse processo é regulado pelo processamento da proteína precursora p100, codificada pelo gene Nfkb2 (Sol, 2010). Assim como as proteínas da família IκB, a p100 se associa a membros do

NF- κ B, atuando como um inibidor dessa via. Seu processamento envolve a degradação seletiva da região C-terminal, que possui semelhança estrutural com as proteínas I κ B. Esse processo não apenas gera a forma ativa p52, mas também facilita a translocação nuclear dos fatores de transcrição previamente retidos, sendo o principal deles o RelB (Sol, 2010; Sun *et al.*, 1994). Um componente central de sinalização dessa via é a quinase indutora de NF- κ B (NIK), que, em conjunto com a quinase a jusante IKK α , promove o processamento da p100 de maneira dependente de fosforilação, garantindo a ativação e regulação dessa via (Murray *et al.*, 2011).

A via canônica exerce grande papel no câncer, sendo importante na sobrevivência e proliferação, transformação epitelial de células tumorais em mesenquimais, angiogênese, metástase e inflamação (Zhang *et al.*, 2021).

Estudos indicam que a ativação de vias de sinalização relacionadas à inflamação está intimamente relacionada à ferroptose (Chen *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023; Deng *et al.*, 2022; Wickert *et al.*, 2024), um mecanismo de morte celular dependente do ferro causada por danos à membrana mediados pela peroxidação lipídica (Tang *et al.*, 2021). A biologia redox desordenada e o aumento da peroxidação lipídica podem ativar múltiplas células e vias inflamatórias, enquanto as citocinas pró-inflamatórias agravam o estresse oxidativo intracelular e a peroxidação lipídica excessiva (Chen *et al.*, 2022). Além disso, NF- κ B pode reduzir a transcrição de moléculas antioxidantes, como GPX4, NQO1 e HMOX1, bem como participar do estresse oxidativo e induzir ferroptose (Yan *et al.*, 2021).

Outro fator crítico na regulação da ferroptose é o Nrf2, um regulador da resposta antioxidante (He; Ru; Wen, 2020). Embora o Nrf2 seja tradicionalmente associado à proteção contra ferroptose (Lee; Roh, 2023), ela pode apresentar menor capacidade antioxidante e aumentar a sensibilidade das células tumorais à ferroptose (Wang *et al.*, 2014)

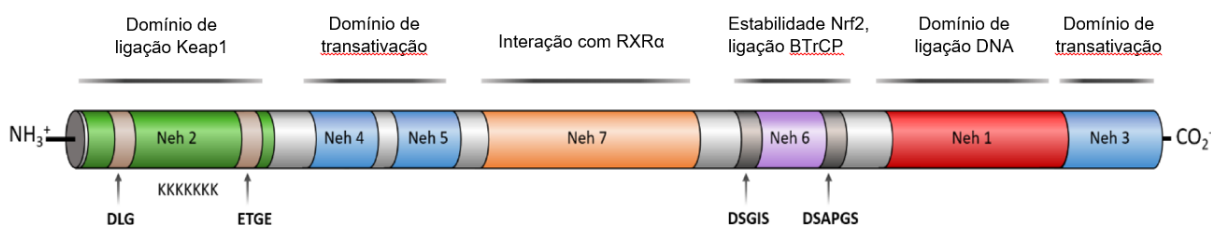
2.4 VIA NRF2

O Nrf2, o fator de transcrição nuclear fator eritroide 2 relacionado ao fator 2, é codificado pelo gene erythroid 2 like 2 (NFE2L2) pertencente a subfamília Cap'n'Collar (CNC) de fatores de transcrição básicos de zíper de leucina (bZIP) (Jaramillo; Zhang, 2013). Esse fator de transcrição foi clonado graças a sua ligação

ao domínio de ligação do NFE2, uma sequência cis-reguladora na região de controle do locus da β -globina importante para a eritropoiese e o desenvolvimento plaquetário (Moi *et al.*, 1994). Logo, esse fator de transcrição, se tornou objeto de diversas pesquisas e foi descoberto que ele media a indução de um conjunto de enzimas metabolizadoras de fármacos (DMEs), como a glutatona S-transferase (GST), Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo Fosfato Trifosfopiridina (NADPH) e quinona oxirredutase 1 (NQO1) (Venugopal; Jaiswal, 1996), tornando-se um dos principais reguladores da resposta celular ao estresse oxidativo e xenobióticos (He; Ru; Wen, 2020).

Nrf2 é uma proteína modular com sete domínios de homologia Nrf2-ECH (Neh1-17) (Figura 2) cada um tendo funções específicas (Tonelli; Chio; Tuveson, 2017).

Figura 2: Estrutura do fator de transcrição Nrf2 humano e a atividade associada a cada domínio.



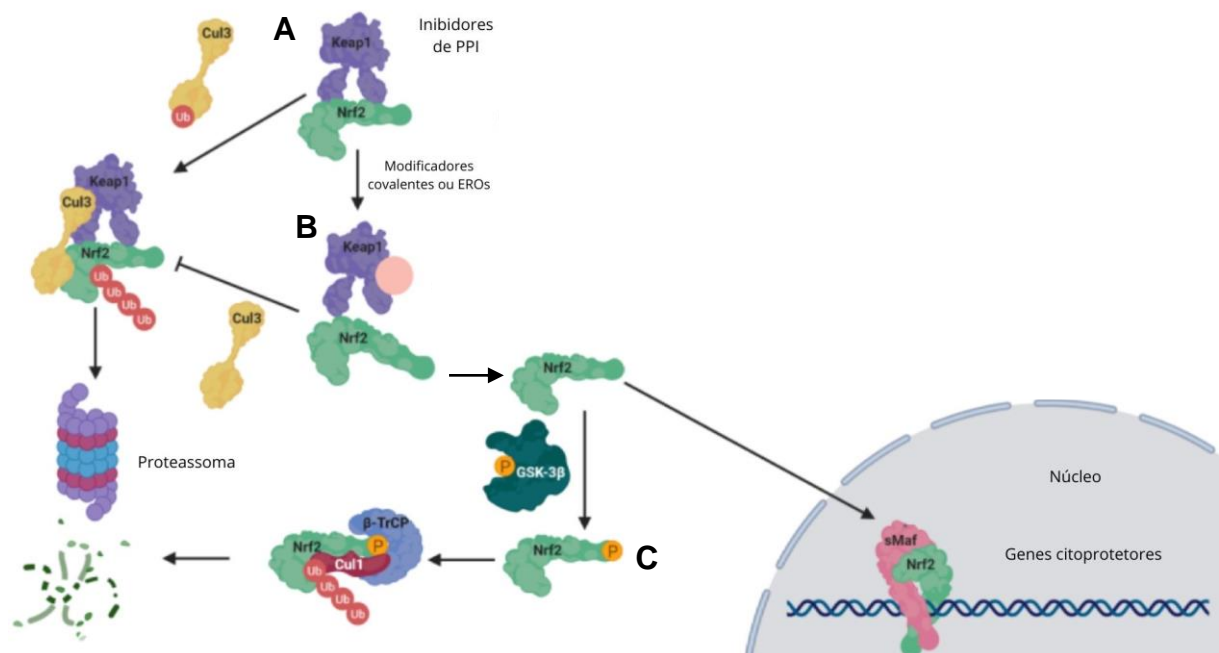
Fonte: Adaptado de Ángel e colaboradores(2020)

O domínio Neh1 compreende a região CNC-bZIP, necessária para a ligação do DNA e associação com parceiros de dimerização, como as pequenas proteínas do Fibrossarcoma Musculoaponeurótico (sMaf) (Tonelli; Chio; Tuveson, 2017). O domínio Neh2 medeia a interação com a proteína 1 associada a ECH semelhante a Kelch (Keap1), uma reguladora negativa de Nrf2 e sete resíduos de lisina direcionados para ubiquitilação e subsequente degradação proteossomal de Nrf2 (Tong *et al.*, 2006). O domínio Neh3 C-terminal atua em conjunto com os domínios Neh4 e Neh5 para ativar transcrições de genes alvos de Nrf2 (Nioi *et al.*, 2005). O domínio Neh6, caracterizado por uma alta concentração de resíduos de serina, desempenha um papel na regulação negativa da estabilidade do Nrf2 por uma via

independente de Keap1. Essa região possui dois domínios peptídicos conservados, DSGIS e DSAPGS, que são reconhecidos pela proteína β -TrCP, que contém repetições transdutoras de β (Chowdhry *et al.*, 2012). O domínio Neh7 está envolvido na repressão da atividade transcricional do Nrf2 pelo receptor α do retinoide X por meio de uma associação física entre duas proteínas (Wang *et al.*, 2013).

A atividade do Nrf2 é rigidamente controlada por diferentes mecanismos que influenciam sua estabilidade, localização e a capacidade de interagir com o DNA (Kasai *et al.*, 2020) (Figura 3).

Figura 3: Regulação Negativa do Nrf2 em condições normais e ativação em condições patológicas.



(A) Em condições normais, o NRF2 é ligado à proteína 1 associada à ECH do tipo Kelch (KEAP1), mantendo-a no citosol. O KEAP1 atua como adaptador da ligase de ubiquitina Cullin 3 (Cul3) que ubiquitina o NRF2, levando à sua degradação pelo proteassoma. (B) Em condições patológicas, na presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou modificadores covalentes, a estrutura do KEAP1 é modificada, liberando o NRF2 no citosol; depois, ele se transloca para o núcleo, onde forma heterodímeros com pequenas proteínas do fibrossarcoma masculoaponeurótico (sMaf) para se ligar às sequências do elemento de resposta antioxidante (ARE), promovendo a expressão de genes de fase II. (C) sob condições patológicas, nas quais a cinase glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β) é superativa, ele pode fosforilar diretamente o NRF2, facilitando sua interação com a proteína contendo repetição β -transdutora do adaptador da ligase Cul1 (β -TrCp) para induzir sua degradação.

Fonte: Adaptado de Ángel e colaboradores(2020)

Dentre os principais reguladores do Nrf2, destacam-se a proteína Keap1 e a via independente de Keap1 mediada por β -TrCP (Kuga *et al.*, 2022). Keap 1 interage com o domínio Neh2 do Nrf2, onde estão localizados sete resíduos de lisina, promovendo sua ubiquitinação através do complexo ubiquitina-ligase Cul3/Rbx1. Essa marcação direciona o Nrf2 para a degradação pelo proteossoma, mantendo seus níveis baixos sob condições fisiológicas normais (Qin *et al.*, 2019). Sob estresse oxidativo ou em presença de eletrofílicos, Keap1 sofre modificações conformacionais devido à oxidação de seus resíduos de cisteína sensíveis ao estresse redox. Isso impede a ubiquitinação do Nrf2, permitindo sua estabilização, acúmulo citoplasmático e subsequente translocação para o núcleo, onde exerce a função transcricional (Velichkova; Hasson, 2005).

Além da via mediada por Keap1, o Nrf2 também pode ser degradado por um mecanismo independente, mediado pela proteína β -TrCP (Kuga *et al.*, 2022). Esse mecanismo envolve a interação entre o domínio Neh6 do Nrf2 e a β -TrCP, no qual facilita a ubiquitinação pelo complexo ubiquitina-ligase SCF (Rada *et al.*, 2011). Além dessas vias, o Nrf2 também pode ser regulado por diferentes modificações pós-traducionais, incluindo fosforilação, acetilação e sumoilação, que afetam sua estabilidade e atividade transcricional (Zhang *et al.*, 2025)

Nrf2 possui papéis duplos como pró-oncogênico e anti-oncogênico em células de câncer de mama e células saudáveis (Kumar *et al.*, 2022). Sob condições normais, o Nrf2 encontra-se no citoplasma ligado à proteínas Keap1 (Tian *et al.*, 2017). No entanto, quando há estresse oxidativo ou exposição a xenobióticos, como radicais livres ou substâncias tóxicas, a Keap1 sofre modificações que impedem a degradação do Nrf2 (Yamamoto; Kensler; Motohashi, 2017). Como resultado, o Nrf2 se estabiliza, se dissocia da Keap1 e transloca para o núcleo e forma heterodímero com pequenas proteínas do sMAF (Cloer *et al.*, 2019). O complexo Nrf2-sMaf liga-se ao Elemento de Resposta Antioxidante (ARE) no DNA (Velichkova; Hasson, 2005). Essa interação ativa a transcrição de diversos genes antioxidantes e de defesa celular, incluindo heme oxigenase-1 (HMOX-1), glutamato-cisteína ligase (GCLM e GCLC), NADPH e NQO1, ajudando na proteção contra danos causados por agentes oxidantes e tóxicos (Ngo; Duennwald, 2022; Soghli *et al.*, 2023). Embora essa

resposta antioxidante seja crucial para a homeostase celular, em células tumorais, a ativação recorrente do Nrf2 confere vantagens adaptativas que favorecem a progressão do câncer, resultando na ativação sustentada de genes antioxidantes e de desintoxicação, o que proporciona um ambiente mais favorável para a sobrevivência celular, proliferação e metástase (Menegon; Columbano; Giordano, 2016).

Outro mecanismo pelo qual o Nrf2 pode atuar como pró-oncogênico envolve a superexpressão da apoptose e a regulação da inflamação (Menegon; Columbano; Giordano, 2016). A ativação crônica do Nrf2 pode reduzir a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia ao inibir vias pró-apoptóticas e promover a expressão de transportadores de efluxo de drogas (Zimta *et al.*, 2019), assim como regula a expressão e atividade de ATP-binding cassette B1 (ABCB1) para impedir o acúmulo intracelular da doxorrubicina (Xia *et al.*, 2019). Além disso, o Nrf2 pode influenciar a modulação do sistema imune, favorecendo um microambiente tumoral imunossupressor que auxilia a evasão da resposta imune (Gan *et al.*, 2024).

Além de seu papel essencial na proteção celular, Nrf2 também pode influenciar a ferroptose, regulando a expressão de diversos genes envolvidos nesse processo (Anandhan *et al.*, 2020), incluindo aqueles ligados à regulação da glutathiona (como SLC7A11 e GAPX4), homeostase do ferro (FTH1, FTL e FPN1), e regeneração do NADPH (G6PD e ME1) (Yan *et al.*, 2023).

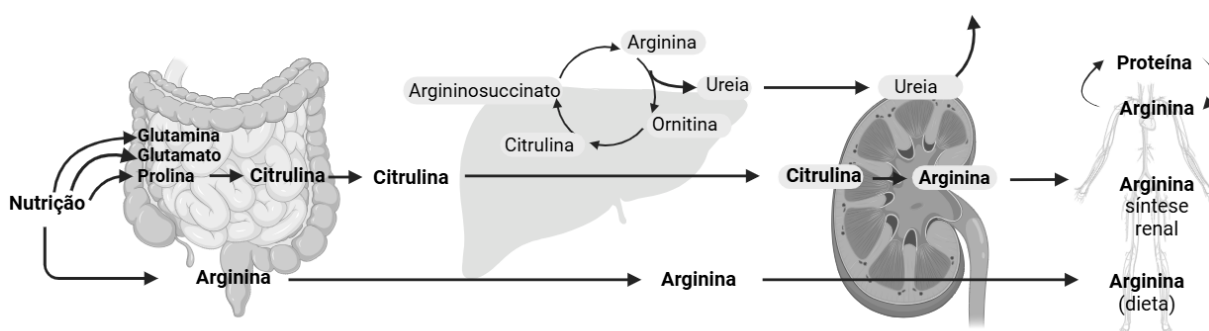
Assim sendo, Nrf2 pode proteger as células contra a ferroptose ao estimular a expressão de genes antioxidantes, como SLC7A11, GCLC e GPX4, que reduzem o acúmulo de peróxidos lipídicos e o estresse oxidativo (Shakya *et al.*, 2023), assim como pode favorecer a ferroptose ao induzir HO-1 e FTH1, que aumentam a liberação de ferro livre, gerando radicais livres e potencialmente intensificando a peroxidação lipídica (Jing *et al.*, 2022). O efeito da ativação de Nrf2, portanto, parece depender, pelo menos em parte, do contexto em que as células tumorais estão submetidas.

2.5 L-ARGININA

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial, ou condicionalmente essencial, porque, em certas condições fisiológicas e patológicas, a síntese endógena torna-se insuficiente para atender à demanda do organismo (Mirini; Agarwal; Didelija, 2015).

A biossíntese natural da L-arg envolve a interação entre o intestino e os rins (Figura 4).

Figura 4: Biossíntese natural de L-arginina



Fonte: Adaptado de Martí e Reith (2021).

No intestino, a L- citrulina é sintetizada a partir de glutamina, glutamato e prolina nas mitocôndrias dos enterócitos por uma série de reações bioquímicas (Wu *et al.*, 2008). Após ser liberada pelo intestino delgado, a L-citrulina é captada pelos rins, onde cerca de 60% da síntese de L-arg ocorre (Theodorou *et al.*, 2021; Szeffel; Danielak; Kruszewski, 2019). Nos rins, a síntese de L-arg a partir da citrulina envolve duas reações enzimáticas (Levillain, 2012). Inicialmente, a enzima argininosuccinato sintase (ASS1) catalisa a conversão da citrulina em argininosuccinato. Em seguida, o argininosuccinato é transformado em L-arginina pela ação da enzima argininosuccinato liase (ASL) e, posteriormente, retorna para a circulação sanguínea (Martí; Reith, 2021). Outra via envolvida na biossíntese de L-arginina ocorre no fígado. Entretanto, quase não há produção de L-arg devido a ação da enzima arginase, abundante neste órgão, em catalisar a L-arg em ureia e ornitina no ciclo da ureia (Zou *et al.* 2019).

A L-arginina é precursora de muitas substâncias biologicamente ativas importantes para o organismo (Szefel; Danielak; Kruszewski, 2019), incluindo óxido nítrico (NO) (Martí; Reith, 2021), uma molécula de sinalização onipresente que se destaca por possuir a capacidade de atravessar livremente membranas celulares (Kumar; Singh; Bhardwaj, 2017). Essa característica permite que o NO atue de maneira eficiente em diferentes compartimentos celulares, regulando uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, como vasodilatação, respostas imunes, inflamação, neurotransmissão, apoptose, regulação de transcrição genética, tradução de mRNA e modificações pós-transducionais de proteínas (Andrabi *et al.*, 2023).

O NO endógeno é gerado a partir da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a conversão da L-arginina em L-citrulina, liberando óxido nítrico como produto (Kumar; Singh; Bhardwaj, 2017). Existem três isoformas principais de NOS: NOS neural (nNOS), endotelial (eNOS) e NOS induzível (iNOS) (Barouch *et al.*, 2002). A nNOS, também conhecida como NOS1, é amplamente expressa em neurônios e desempenha um papel essencial na sinalização neural (Costa *et al.*, 2016). A eNOS está presente predominantemente nas células endoteliais, sendo crucial para a regulação da pressão arterial e para a homeostase vascular (Forstermann; Sessa, 2012). Essas duas isoformas, por serem expressas continuamente em condições fisiológicas, são também denominadas NOS constitutiva. Além disso, ambas dependem de um aumento na concentração de cálcio no tecido para a sua atividade, produzindo, assim, concentrações baixas e transitórias de NO (Choudhari *et al.*, 2013). Em contraste, a iNOS (NOS2) é uma isoforma induzível e independente de cálcio (Choudhari *et al.*, 2013). É expressa principalmente em células do sistema imunológico, sendo induzida em respostas a estímulos inflamatórios ou infecciosos, o que a torna relevante em processos de defesa do organismo (Sonar; Lal, 2019).

Para que a atividade catalítica da NOS ocorra de forma eficiente, a enzima depende de alguns cofatores, como NADPH, que fornece os elétrons necessários para a reação, e a tetraidrobiopterina (BH₄), essencial para estabilizar o intermediário reativo e garantir a produção de NO (Tenopoulou; Doulias, 2020).

Outros cofatores importantes incluem o FMN (flavina mononucleotídeo) e o FAD (flavina adenina dinucleotídeo), que participam do transporte de elétrons dentro da enzima, além do grupo heme, responsável pela ligação e ativação do oxigênio molecular para a produção de NO (Stuehr; Pou; Rosen. 2001).

O NO desempenha um papel vital no câncer de mama, apresentando uma dualidade de efeitos que podem ser tanto supressores, quanto promotores de tumor. Em diferentes concentrações, o NO pode induzir ou inibir o desenvolvimento do câncer, dependendo da fosforilação dos reguladores envolvidos nas vias de sinalização a montante e a jusante do óxido nítrico (Liu *et al.*, 2021). Em baixas concentrações (nano a picomolares), o óxido nítrico pode levar à promoção do tumor por meio da proliferação celular, respostas antiapoptóticas, angiogênicas, e sobre a invasão e migração (Jahani *et al.*, 2019; Mishra; Patel; Banerjee, 2020). Em oposição às suas funções promotoras de tumor, em concentrações mais altas (micromolar) o NO inibe o crescimento e facilita o processo de apoptose das células (Andrabi *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2021).

Dado os mecanismos de ação da L-arginina e seu produto, o NO, torna-se viável considerar o uso desse aminoácido como uma estratégia terapêutica no tratamento do câncer de mama. Embora ainda sejam escassos estudos da relação da L-arginina com o câncer de mama, algumas evidências experimentais reforçam a relevância desses mecanismos. Por exemplo, Jahani *et al.* (2017) em sua pesquisa *in vitro* demonstraram que houve uma diminuição na viabilidade de células de câncer de mama tratadas com L-arginina. Além disso, estudo *in vivo* em modelos murinos mostraram que o tratamento com L-arginina inibiu o crescimento do tumor e prolongou o tempo de sobrevivência de camundongos (Cao *et al.*, 2016).

Portanto, a investigação dos efeitos do tratamento das células tumorais MDA-MB-231 com a L-arginina se torna necessária para elucidar de maneira mais aprofundada seus impactos nas previsões celulares, assim como os mecanismos subjacentes à inflamação e à resistências dessas células. Essa investigação poderá contribuir significativamente para a compreensão dos processos biológicos envolvidos, além de abrir novas perspectivas terapêuticas no combate ao câncer.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do tratamento com L-arginina na viabilidade celular e vias relacionadas à inflamação em células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB 231).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Avaliar a viabilidade celular das células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de L-arginina;
- 3.2.2 Quantificar a expressão de proteica de NRF2 e NFkB;
- 3.2.3 Mensurar citocinas inflamatórias após o tratamento;
- 3.2.4 Relacionar os efeitos dos tratamentos sobre a inflamação e viabilidade celular;
- 3.2.5 Determinar os produtos avançados de oxidação proteica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem MDA-MB 231 de câncer de mama foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Após o descongelamento e remoção da solução crioprotetora, as células foram transferidas para frascos de cultura com área de 25cm² contendo meio de cultura RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina - estreptomicina. As células foram incubadas a 37 °C em uma incubadora umidificada sob uma atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂.

As células arranjadas em monocamada foram submetidas à uma dissociação enzimática com 2ml de tripsina. Após a neutralização da atividade desta enzima utilizando 3ml do meio de cultura, o pool de células foi transferido para novas garrafas, com área de 75cm². Posteriormente, a linhagem foi tratada por um período de 48hrs com L-arginina nas seguintes concentrações: NT (não tratada), 800ug/mL, 1600ug/mL, 3200ug/ml.

4.2 CONTAGEM DE CÉLULAS

Para determinar o número de células obtidas durante a cultura, foi realizada a contagem utilizando a câmara de Neubauer. Das células em suspensão foram transferidas 0,1 mL para um eppendorf e adicionado 0,3mL de PBS ao eppendorf, obtendo assim uma diluição 1/4. Desse total, foi retirado 0,005mL e adicionado à câmara de Neubauer. As células sedimentaram por 2min e a contagem foi feita nos 4 quadrantes e calculada a média. Como a suspensão foi inicialmente diluída a 1/4, o número de células contadas será igual à média multiplicada pelo fator de diluição, neste caso, 4. O número de células/mL foi obtido utilizando a seguinte equação:

$$NC: Nt/Nq \times FD \times 10.000$$

NC: número de células /mL

Nt: número total de células contados (média)

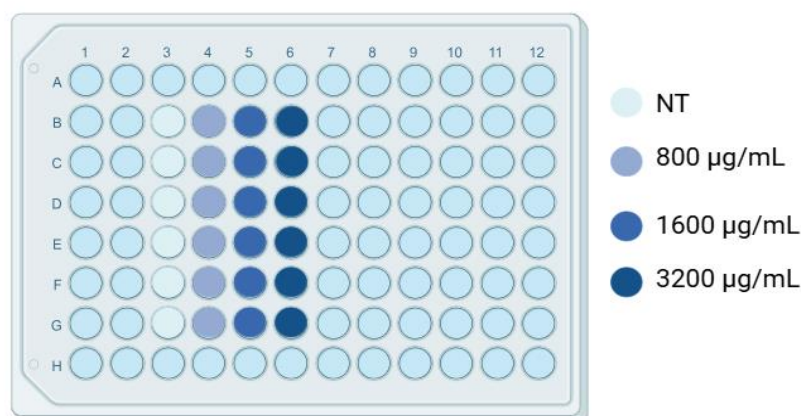
Nq: número de quadrantes;

FD: fator de diluição.

4.3 PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

O ensaio AlamarBlue (AlamarBlue™ Cell Viability Assay Reagent, ThermoFischer) foi utilizado para medir a proliferação celular e avaliar a viabilidade da linhagem MDA-MB 231 tratada com L-arg. O teste foi realizado em placas de 96 poços (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ). Do total de 96 poços, foram utilizados 06 poços para cada amostra, pois testes prévios demonstraram maior eficácia durante a análise. Os demais poços sem células continham apenas o preparado com meio de cultura e AlamarBlue, esses foram utilizados para descontar o background (fluorescência natural do meio e AlamarBlue). Cada um dos seis poços continha 200.000 células a serem testadas com meio de cultura. O total de 200ul de solução AlamarBlue foram adicionados ao preparado com meio de cultura RPMI e distribuído nos poços (100ul). As placas foram incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por um período de duas horas para cada leitura. A fluorescência do processo de redução da resazurina em resorufina foi medida usando o Leitor Multidetecção Híbrido Synergy H1 (Biotek®) com os comprimentos de onda de excitação/emissão definidos em 531/560 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos de acordo com a reação do reagente com as células viáveis, descontando o background. Experimentos e análises envolvendo análise de proliferação e viabilidade celular foram realizados no Laboratório de Análises Biomoleculares (LABIOM) da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória - ES, Brasil (<http://labiom.ufes.br>).

Figura 5: Placa de Proliferação e Viabilidade Celular



Fonte: Elaborado pela autora.

4.4 ESTUDO DA EXPRESSÃO PROTEICA

4.4.1 WESTERN BLOT PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNAS

A técnica de Western Blot foi utilizada para determinar a influência do tratamento da L-arginina em células MDA-MB 231 sobre a expressão proteica de NRF2 e NFkB, e as bandas foram normalizadas por GAPDH nos grupos NT (não tratada), 800ug/mL, 1600ug/mL, 3200ug/mL.

4.4.2 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS E QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

As amostras foram preparadas utilizando células tratadas de todos os grupos. Os pellets de células foram mantidos a -80°C até o momento da extração proteica, que foi realizada em 4000 µL de tampão de lise (10mM Tris – HCl pH 7,4, 1mM NaVO₃, 1% SDS, 0,5mM DTT, 5mM EDTA, 1mM PMSF), ao qual se adicionou 10µg/m coquetel inibidor de proteases. A homogeneização foi realizada com auxílio de sonicador ultrassônico, sendo seguida de centrifugação a 6000 rpm, 4°C por 15 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos, aliquotados e armazenados a -80 °C.

A determinação do conteúdo de proteína total das células MDA-MB-231 foi feita utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando o reagente Bradford (Sigma Aldrich). Um protocolo para microplacas de 96 poços de fundo chato foi escolhido. A quantificação foi feita de acordo com informações do fabricante. A curva padrão foi preparada em triplicatas, com concentrações de zero (branco) até 1,4 mg/mL de albumina do soro bovino – BSA. As amostras foram diluídas 10 vezes para a quantificação, sendo realizada em triplicatas. Posteriormente, foi calculado o volume necessário para uma carga de 50 µg de proteína, sendo este volume de amostra misturada, em partes iguais, com tampão de homogeneização. Alíquotas do homogeneizados foram diluídas em solução de Laemmli 2X (0,5 mM de ureia, 0,17mM de SDS, 39µM de ditiodiol, 0,01 M de Tris e azul de bromofenol 0,5%). As amostras depois de preparadas eram aquecidas a 950 durante 4 minutos.

4.4.3 ELETROFORESE EM GEL DESNATURANTE (SDS-PAGE)

As amostras foram carregadas em géis de SDS-poliacrilamida 10% para Nrf2 e GAPDG e de 6% para NFkB (1,5 M Tris HCl pH: 8.8, acrilamida 40%, glicerol 100%, SDS 10%, APS 10% e Temed) previamente imersos em um tampão para eletroforese (25mM de Tris HCl, 190mM de glicina e 0,1% de SDS). Antes da sua aplicação no gel as amostras foram aquecidas a 100 °C durante 5 min. A eletroforese foi conduzida com o tampão (25mM de tris-HCl pH 8,3, 192mM de glicina e 0,1% de SDS), a 80 volts por aproximadamente 2 horas e 30 minutos (PowerPac™ HC, BioRad, Singapura).

4.4.4 TRANSFERÊNCIA DAS PROTEÍNAS

Depois de separadas, as proteínas das amostras para avaliar a expressão da Nrf2, NFkB e GAPDH foram transferidas para uma membrana de PVDF utilizando uma cuba molhada (Biorad), por 2:00 hs, 60 volts a 4°C, com tampão de transferência constituído de 25 mM de tris-HCl pH 8,3, 192 mM de glicina e 20% (v/v) de metanol.

4.4.5 INCUBAÇÃO DOS ANTICORPOS

Após a transferência, as membranas de PVDF foram incubadas por 2:30 horas em uma solução constituída de leite em pó desnatado (5%) em tampão TBStween 0,1% (20 mM de tris-HCl pH 7,4 e 150 mM de NaCl), à temperatura ambiente sob agitação leve, para evitar ligações inespecíficas com reativos não imunológicos. Em seguida, as membranas foram incubadas por 4 horas a temperatura ambiente, sob agitação, em TBS-tween adicionado mais os seguintes anticorpos primários: Nrf2 e NFkB (1: 1000, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e para GAPDH (1:5000, Santa Cruz Biotechnology, California, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas em tampão TBS-tween 0,1%, sob agitação leve em temperature ambiente e incubadas com o anticorpo secundário (IgG, anti-mouse conjugado a peroxidase - 1:3000, Abcam Inc.) por 1:30 horas, à temperature ambiente, sob agitação suave, seguida de lavagem com tampão TBS-tween 0,1%, e posteriormente com tampão TBS.

Os imunocomplexos foram detectados por reação de quimioluminescência por meio da exposição da membrana, durante 5min a um sistema de detecção (ECL Plus, AmershamTM, GE Healthcare, UK). As membranas, então, foram expostas a autorradiografia (Medical Film, Konica Minolta Medical Imaging, Wayne, EUA/Hyperfilm, AmershamTM, UK) pelo aparelho ChemiDoc (BioRad), sendo as bandas impregnadas e posteriormente reveladas. O programa ImageLab foi utilizado para quantificar a área da densidade das bandas corrigidas pela proteína controle (GAPDH).

4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS POR CITOMETRIA DE FLUXO

A dosagem das citocinas inflamatórias foi medida por citometria de fluxo por kit CBA (Cytometryc Bead Array - Human Th1/ Th2/ Th17 Cytokine Kit) de acordo com instruções do fabricante. Antes da análise propriamente dita, foi elaborada uma curva padrão com concentrações variando de 20 a 5000 pg/ml, que serviu de referência para determinar as concentrações das citocinas em estudo.

Para a análise, foi preparado um conjunto de microesferas específicas para as citocinas a serem avaliadas, o qual foi adicionado 25 ul. Posteriormente, foram incorporados anticorpos monoclonais anti-citocinas, conjugados ao fluorocromo ficoeritrina (PE). Após o processo de marcação, a fluorescência de 500 microesferas por amostra foi lida em citometria de fluxo FACSCanto II (BD). A análise foi baseada em gráficos de dispersão que relaciona o tamanho (FSC) com granularidade (SSC), enquanto as diferentes populações de esferas foram discriminadas de acordo com suas respectivas intensidades de fluorescência ao longo do eixo Y (detector de fluorescência 4, no qual captura a luz no comprimento de onda em torno de 650nm, correspondente a cor vermelha).

4.6 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEÍCA (ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS – AOPP)

Os valores de AOPP foram determinados por espectrofotometria em leitora de microplacas (Leitora Multidetecção Synergy 2, 39 Biotek Instruments) de acordo com Witko-Sarsat et al. (1996). A reação foi calibrada com cloramina-T (Sigma, ST Louis, MO, USA) na presença de iodeto de potássio a 340nm. Para as análises realizou-se

uma diluição de 1:100 (02 µl de amostra para 198µl de PBS). Em poços padrões, foram adicionados 10µl de iodeto de potássio 1.16M (Sigma) e 200µl de solução de cloramina-T (0-100µl) seguido de 20µl de ácido acético glacial. A densidade óptica da mistura reativa será lida após agitação de seis minutos programada pelo próprio leitor em 340nm contra um controle contendo 200µl de PBS e 20µl de ácido acético glacial. As concentrações de AOPP serão expressas como µM de cloramina-T. Experimentos e análises envolvendo AOPP foram realizados no Laboratório de análises Biomoleculares (LABIOM) da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória-ES, Brasil (<http://labiom.ufes.br>).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism* 8.0.2 (Prism versão 8.0.2 para Windows Software, La Jolla California USA). A significância estatística de todos os dados experimentais foi determinada usando análise de variância de uma via (ANOVA) e o teste de Tukey. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Cada ponto ou coluna representa a média +EPM. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

5. RESULTADOS

5.1 VIABILIDADE CELULAR E CAPACIDADE PROLIFERATIVA DAS CÉLULAS MDA-MB-231

A viabilidade celular foi menor nos grupos de células tratadas nas concentrações de 1600 e 3200 µg/mL quando comparadas ao grupo não tratado (Figura 6).

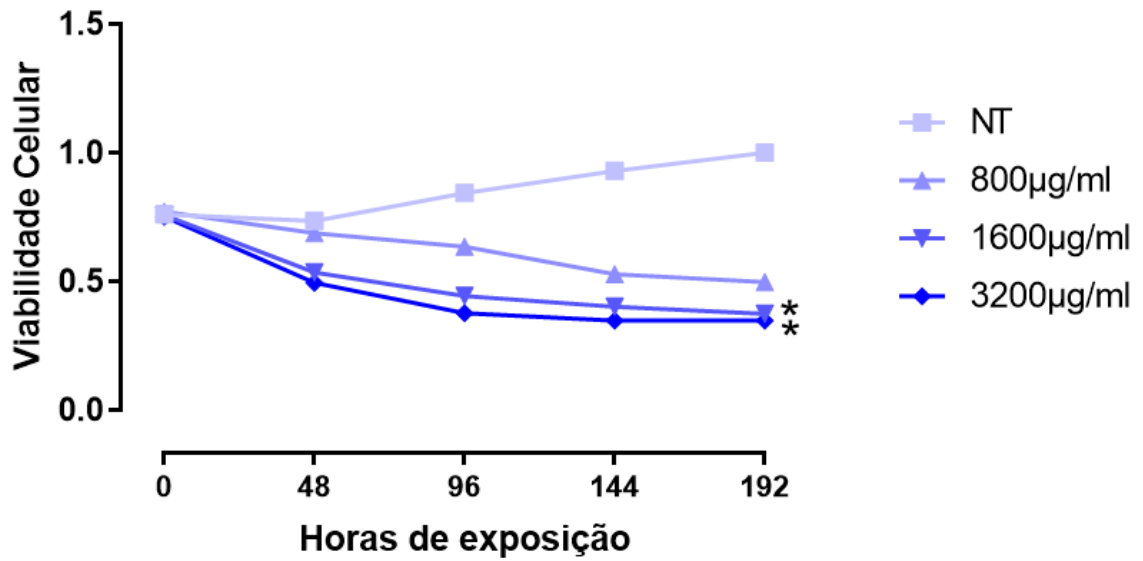


Figura 6: Efeitos do tratamento com L-arginina em diferentes concentrações (800ug/mL; 1600ug/mL; 3200ug/mL) sobre a viabilidade e a resistência terapêutica de células MDA-MB. Valores expressos em média \pm EPM; (n = 3 por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo NT (não tratado).

A análise dos dados mostrou uma diminuição da AUC conforme as concentrações aumentavam (figura 7). O grupo NT (não tratado) exibiu maior área sob a curva, já os grupos tratados com 1600 e 3200 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram reduções estatisticamente significativas.

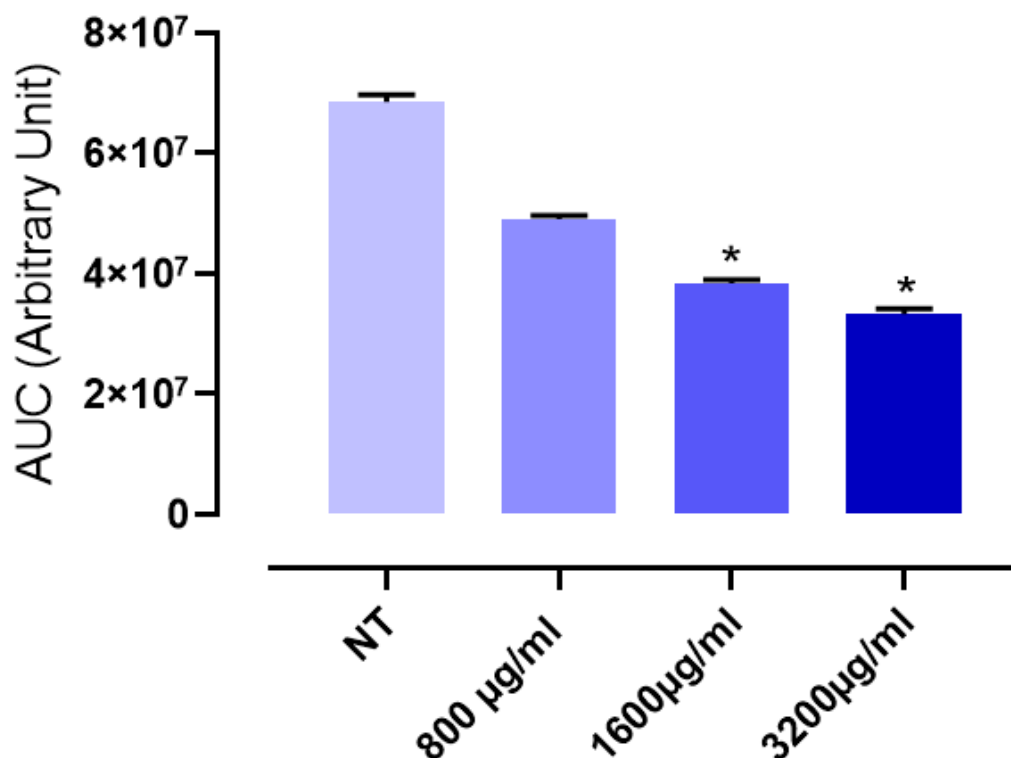


Figura 7: Área sob a curva (AUC): Efeitos do tratamento de L-arginina em diferentes concentrações (800µg/mL, 1600µg/mL, 3200) sobre a viabilidade e a capacidade proliferativa de células MDA-MB. Valores expressos em média ± EPM; (n = 3 por grupo). *p < 0,05 em relação ao grupo NT (não tratado).

5.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO PROTEÍCA

Foi observado aumento na expressão de NRF2 nos grupos tratados com L-arginina 1600 e 3200 µg/mL em comparação ao grupo não tratado (Figura 8-B). Da mesma forma, a expressão de NF-κB apresentou aumento diretamente proporcional a concentração de L-arginina, sendo significativamente maior no grupo tratado com a dose de 3200µg/mL (Figura 8-C). Essa dose apresentou diferença significativa quando comparada com o grupo não tratado e com o grupo de 800µg/mL.

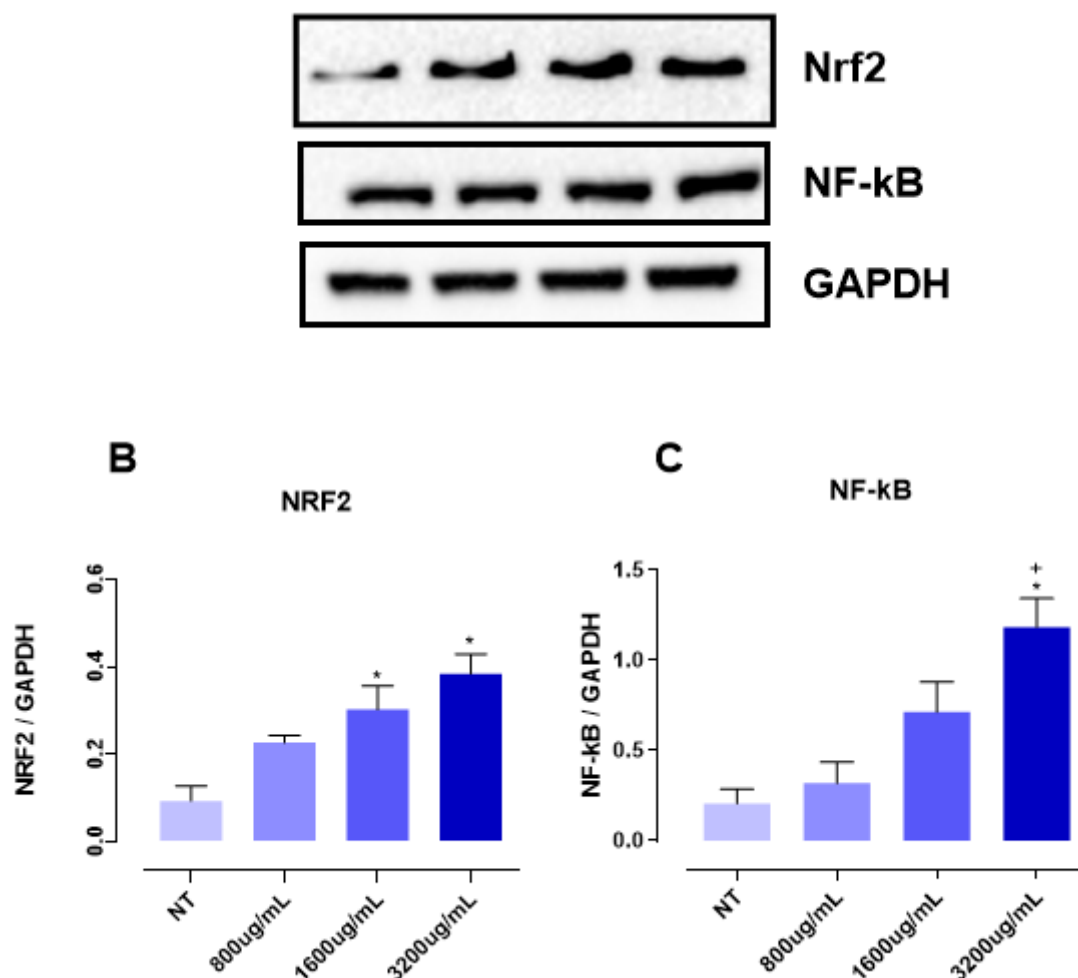


Figura 8: Efeitos do tratamento de L-arginina em diferentes concentrações (800 µg/mL; 1600 µg/mL; 3200 µg/mL) sobre a expressão proteica de Nrf2 (B) e NFκB (C) em células MDA-MB-231. A figura (A) representa as bandas referente a expressão proteica. Valores expressos em média ± EPM; (n= 3 por grupo) com * p< 0,05 em relação ao grupo NT; + p<0,05 em relação ao grupo L-arg (800µg/mL).

5.3 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS NAS CÉLULAS MDA-MB-231

Os níveis de IL-17A apresentaram aumento nos grupos tratados com 1600 e 3200 µg/mL (Figura 9-A), sendo que a maior concentração mostrou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle e ao grupo tratado com 800µg/mL. Os níveis de IL-10 foram reduzidos em todos os grupos tratados quando comparados ao grupo não tratado (Figura 9-B). A quantificação de IL-6 revelou aumento no grupo tratado com 3200µg/mL (Figura 9-C), apresentando diferença significativa em relação ao grupo tratado com 800µg/mL e ao grupo não tratado. Por

outro lado, os níveis de IL-4 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (Figura 9-D). A análise de IL-2 demonstrou um aumento significativo no grupo tratado com 3200 μ g/mL em relação ao grupo NT e ao grupo tratado com 800 μ g/mL (Figura 9-E).

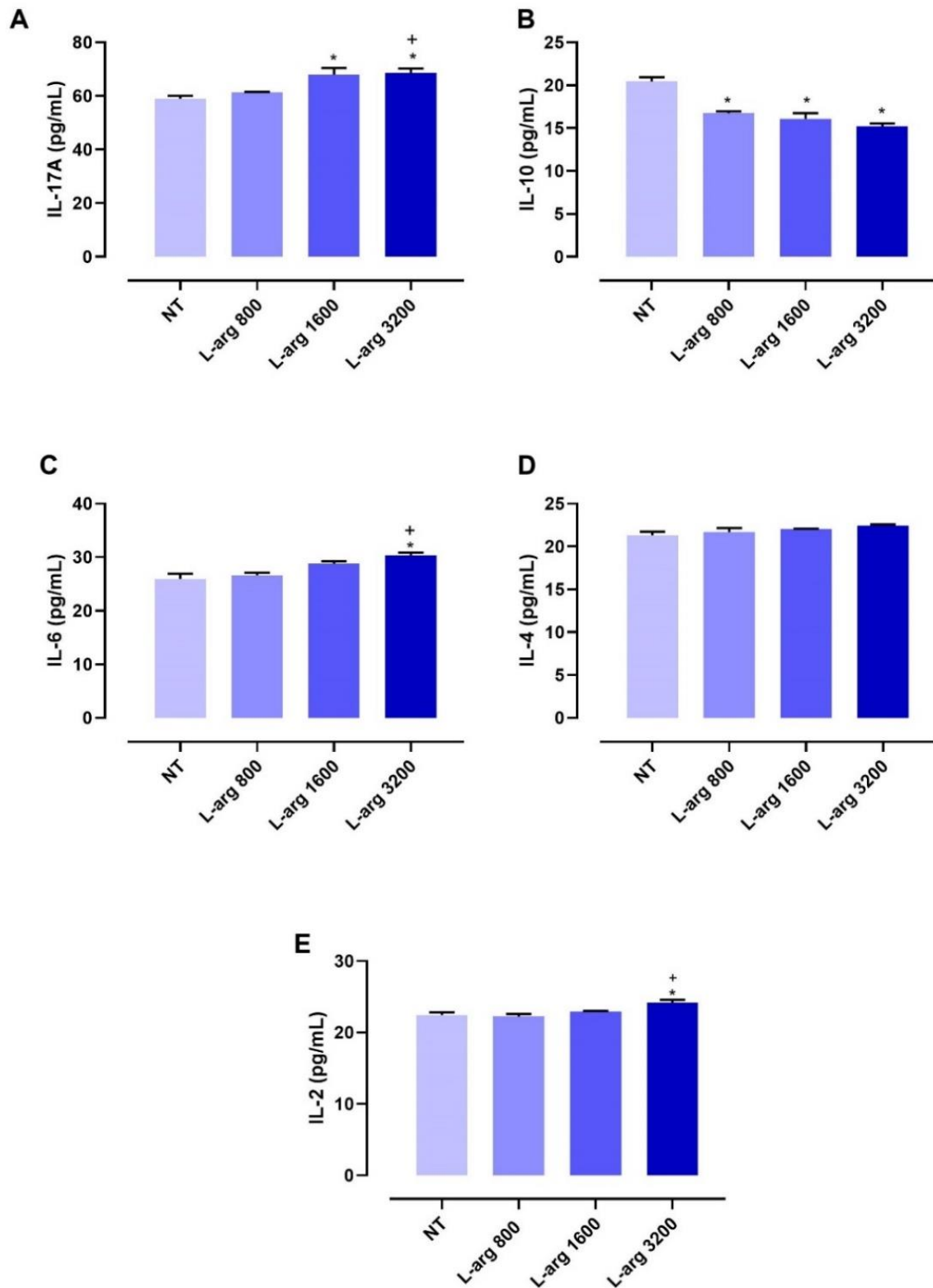


Figura 9: Efeitos do tratamento de L-arginina em diferentes concentrações (800 µg/mL; 1600 µg/mL; 3200 µg/mL) sobre as citocinas IL17A (A), IL-10 (B), IL-6 (C), IL-4 (D) e IL-2 (E). Valores expressos em média ± EPM; (n= 3 por grupo). * p< 0,05 em relação ao grupo NT; + p<0,05 em relação ao grupo L-arg (800ug/mL).

A concentração de INF-γ apresentou aumento em todas as doses do tratamento (Figura 10-A). Entretanto, apenas a maior dose apresentou diferença significativa do grupo controle e do grupo de menor dose de 800µg/mL. Em contraste, os níveis de TNF-α não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (Figura 10-B).

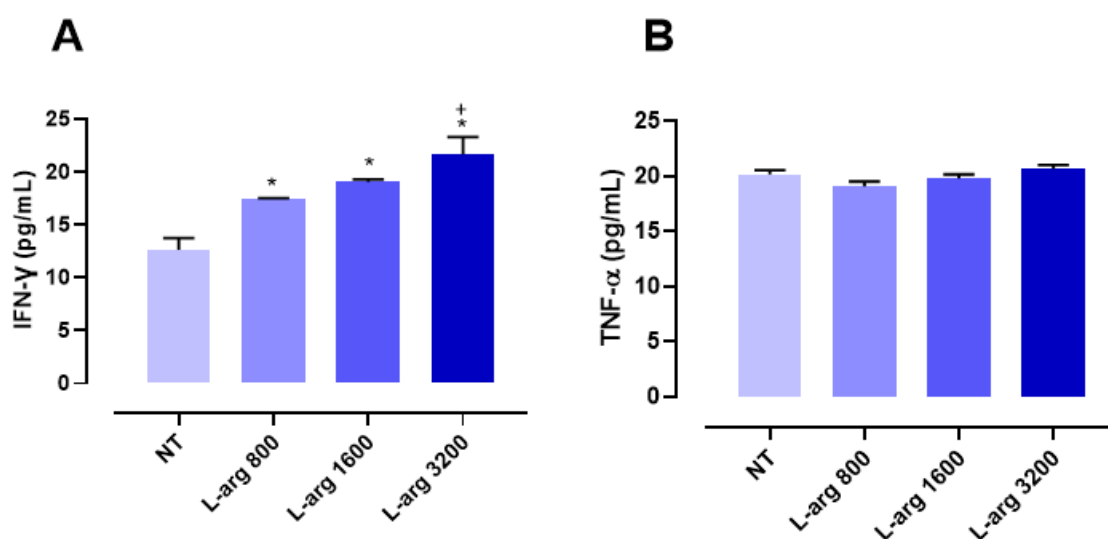


Figura 10: Efeitos do tratamento de L-arginina em diferentes concentrações (800 µg/mL; 1600 µg/mL; 3200 µg/mL) sobre as citocinas INF-γ (A) e TNF-α (B). Valores expressos em média ± EPM; (n= 3 por grupo). * p< 0,05 em relação ao grupo NT; + p<0,05 em relação ao grupo L-arg (800ug/mL).

5.4 DETERMINAÇÃO DOS PRODUTOS AVANÇADOS DE OXIDAÇÃO PROTEICA (ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS – AOPP)

O AOPP tem sido considerado um novo marcador de oxidação proteica e de inflamação. É formado na presença do estresse oxidativo como um produto da reação de proteínas plasmáticas com oxidantes clorados. Observou-se aumento dos

produtos avançados da oxidação proteica nas duas maiores concentrações (1600 µg/ml e 3200 µg/ml.) quando comparados com o grupo NT. E a maior concentração (3200 µg/ml.) apresentou diferença significativa em relação a dose de 800 µg/ml, conforme figura 11.

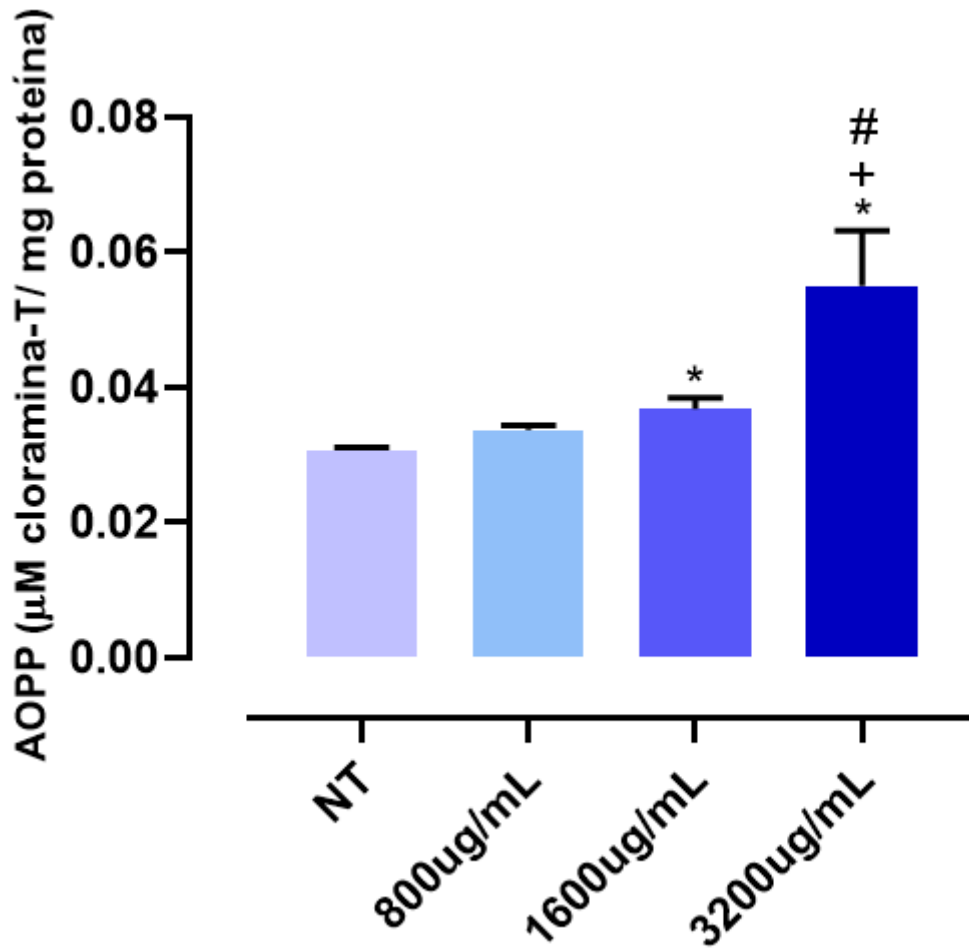


Figura 11: Efeitos do tratamento com L-arginina em diferentes concentrações (800ug/mL; 1600ug/mL; 3200ug/mL) sobre os níveis de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) de células MDA-MB-231. Valores expressos em média \pm EPM; (n = 3 por grupo). * $p < 0,05$ em relação ao grupo NT; + $p < 0,05$ em relação ao grupo L-arg (800ug/mL).

6 DISCUSSÃO

Vários modelos experimentais tem sido utilizados na pesquisa sobre o câncer de mama de modo a melhor compreender os processos de iniciação, promoção e progressão tumoral na tentativa de desenvolver estratégias de prevenção e tratamento cada vez mais eficazes.

Embora muito esforço seja direcionado à descoberta de terapias para TNBC, o sucesso em discriminar os eventos críticos que estabelecem as características peculiares desse subtipo de tumor tem sido limitado (Pal; Childs; Pegram, 2011). Assim, é crucial investigar mecanismos moleculares críticos e específicos deste tipo de tumor, auxiliando em um melhor entendimento sobre suas características, e apoiar outros estudos acerca do desenvolvimento de terapias-alvo.

Neste contexto, um dos achado mais relevantes deste estudo foi a redução significativa na viabilidade e proliferação das células MDA-MB-231 tratadas com L-arg, sugerindo um potencial efeito citotóxico nessas células. Esses efeitos foram acompanhados pelo aumento na expressão de Nrf2 e NF- κ B, além da elevação de IL-17A, IL-6, IL-2 e IFN- γ e redução dos níveis de IL-10, bem como aumento nos produtos avançados de oxidação proteica.

A L-arginina é um aminoácido condicionalmente essencial que desempenha papéis fundamentais na fisiologia celular, principalmente por ser precursora do NO (Mirini; Agarwal; Didelija, 2015). Esse aminoácido tem sido investigado por suas propriedades antitumorais (Sato *et al.*, 2020), visto que o NO é uma molécula que possui várias funções no sistema biológico, incluindo vasodilatação e modulação do sistema imunológico, além de induzir estresse oxidativo e afetar a função mitocondrial, podendo promover a morte celular em células tumorais (Lundberg; Weitzberg, 2022). Além disso, o NO pode interagir com EROs para formar peroxinitrito (ONOO⁻), uma molécula altamente reativa que pode induzir danos ao DNA e peroxidação, resultando em morte celular programada (Chandimali *et al.*, 2025; Pacher; Beckman; Liaudet, 2007).

A redução significativa da viabilidade celular observada nas células MDA-MB-231 tratadas com 1600 e 3200 μ g/mL de L-arginina, determinada através do ensaio

de AlamarBlue, pode estar relacionada ao efeito citotóxico da L-arg, mediada pela síntese de óxido nítrico, que contribui para o aumento do estresse oxidativo podendo levar à morte celular, especialmente em concentrações mais elevadas. Esse efeito foi previamente relatado por Jahani et al. (2017), em células MCF-7, onde o tratamento com L-arginina induziu um aumento na produção de NO, resultando em apoptose. Vale ressaltar que, diferente da linhagem MDA-MB-231, as células MCF-7 possuem receptores hormonais (Derakhshan; Filho, 2022), indicando que a L-arg pode exercer um efeito citotóxico independente da expressão de receptores hormonais. Resultados semelhantes foram observados na linhagem MDA-MB-648, outro modelo de TNBC, onde o tratamento com L-arg induziu apoptose após 48 horas (Singh *et al.*, 2000).

Evidências *in vivo* também demonstraram um potencial efeito antitumoral da L-arg. Cao e colaboradores (2016) observaram que a suplementação com L-arginina foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral e prolongar o tempo de sobrevivência de camundongos com tumor, sugerindo que a L-arginina pode ter efeitos anticancerígenos em modelos animais, o que reforça a possibilidade de sua aplicação clínica.

A presente pesquisa também investigou a expressão de proteínas associadas ao estresse oxidativo e à inflamação como Nrf2 e NF- κ B, em linhagens MDA-MB-231 tratadas com L-arginina. As células tratadas com concentrações de 1600 e 3200 μ g/mL de L-arginina mostram um aumento significativo na expressão de ambas as proteínas, o que pode indicar a ativação de vias celulares associadas à resposta ao estresse e à inflamação.

Nrf2 é um fator de transcrição que regula a defesa celular contra o estresse oxidativo por meio da expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes (He; Ru; Wen, 2020). Estudos demonstram que os níveis de Nrf2 estão elevados no câncer de mama triplo negativo (Bovilla et al., 2021) e sua ativação pode estar associada à progressão tumoral, proliferação celular e resistência terapêutica (Zhang et al., 2016; Carlise et al., 2017).

Uma possível explicação para essa ativação pode estar na via de sinalização Nrf2-HMOX1. Lin e colaboradores (2024) demonstraram que a superexpressão do fator de transcrição EGR1 em células MDA-MB-231 e MDA-MB-468 pode promover ferroptose ao regular a fosforilação de Nrf2 e induzir a expressão de HMOX1. Essa via possui papel na homeostase do ferro, pois HMOX1 catalisa a degradação do heme liberando íon ferroso (Fe^{2+}), monóxido de carbono e biliverdina. Wang e colaboradores (2023) relataram que os níveis de Fe^{2+} são significativamente mais elevados no TNBC em comparação a outros subtipos de câncer de mama. Esse acúmulo de ferro pode influenciar no destino celular, especialmente quando há superexpressão de Nrf2. O aumento de HMOX1 induzido por Nrf2 pode resultar em um acúmulo excessivo de Fe^{2+} , desencadeando aumento na liberação de radicais de oxigênio (Wang et al., 2023).

De fato, alguns estudos indicam que a ativação de Nrf2 pode, em certas condições, induzir respostas citotóxicas em vez de favorecer a proliferação celular (Wang et al., 2023; Lin et al., 2024). Esse efeito pode estar relacionado a mecanismos como ferroptose, um tipo de morte celular intimamente relacionada a várias vias metabólicas envolvendo ferro, espécies reativas de oxigênio e metabolismo lipídico (Tang et al., 2020). O estresse oxidativo excessivo e a interrupção dos sistemas redox causam a peroxidação lipídica excessiva, o que leva ainda ao aumento da densidade da membrana mitocondrial, à fratura da crista mitocondrial e à perda da integridade da membrana plasmática, causando morte celular ferroptótica (Liu et al., 2023).

NF- κ B é um fator de transcrição central na regulação de diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, sobrevivência, resposta ao estresse e resposta imune (Yu et al., 2020). No câncer de mama, sua ativação está frequentemente associada a um fenótipo mais agressivo, contribuindo para a progressão tumoral e resistência a terapias (Pavitra et al., 2023; Sarkar et al., 2013; Mutairi; Habashy, 2023).

Em nosso estudo, observamos um aumento na ativação de NF- κ B acompanhado por uma redução na proliferação celular das células MDA-MB-231. Embora NF- κ B seja classicamente associado à sobrevivência celular e resistência a

apoptose (Wu; Sun; Xu, 2023), essa via também pode desempenhar um papel na indução da ferroptose (Yan *et al.*, 2021). NF- κ B pode reduzir a transcrição de moléculas antioxidantes, como GPX4 e NQO1, aumentando o acúmulo de ROS, levando a ferroptose (Yan *et al.*, 2021). Além disso, Yang e colaboradores (2020) também mostraram em sua pesquisa com células de câncer de colón que o HMGB1 pode aumentar a sinalização de NF- κ B e, conseqüentemente, regular negativamente a atividade de GPX4. Isso sugere que, em determinadas condições, NF- κ B pode estar associado a processos inflamatórios que intensificam a ferroptose em células tumorais. No entanto, no presente estudo, não foram avaliados diretamente marcadores específicos da ferroptose, como GPX4 ou níveis de peroxidação lipídica, o que representa uma limitação do trabalho.

Nosso achados corroboram os resultados de Yuan *et al.* (2025), que demonstraram que o tratamento combinado com paclitaxel (PTX) e RSL3 reduziu significativamente a viabilidade celular das linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-468, ao mesmo tempo que aumentou a ativação de NF- κ B. A ativação da via NF- κ B também está diretamente relacionada à indução de citocinas inflamatórias, que desempenham um papel essencial no metabolismo do ferro e no equilíbrio do sistema redox (Ueda; Takasawa, 2018).

Em nossos estudos observamos um aumento significativo nas citocinas inflamatórias IL-17A, IL-6, IL-2 e IFN- γ , reforçando a hipótese de que a ativação de NF- κ B pode estar promovendo um perfil inflamatório nas células MDA-MB-231, o que pode, por sua vez, contribuir na ativação de vias de morte celular, como a ferroptose. A IL-6 é uma citocina pleiotrópica que modula o fenótipo de muitos tipos de câncer ligando-se aos receptores de IL-6 e ativando vias a jusante, promovendo assim a iniciação, desenvolvimento e metástase do tumor (Kesanakurti *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2022). Visto que no presente trabalho, os níveis dessa interleucina aumentaram, é possível que esse achado esteja relacionado ao papel central da IL-6 na regulação da ferroptose. Essa citocina modula a expressão de hepcidina, uma proteína que controla a homeostase do ferro e pode influenciar diretamente a disponibilidade desse metal para as reações oxidativas (Rosenblum, 2023). Sano e colaboradores (2021) em sua pesquisa, perceberam que a IL-6 aumentou a

apoptose dependente de TNF- α ou TRAIL em muitos tipos de células cancerígenas humanas, incluindo MDA-MB-231. Adicionalmente, Zhu e colaboradores descobriram que a expressão da proteína IL-6 foi regulada positivamente em GMECs tratados com LPS. A expressão de marcadores de estresse oxidativo e ferroptose foi detectada posteriormente, e foi descoberto que o conteúdo de Fe²⁺ foi aumentado, e os níveis de estresse oxidativo foram regulados positivamente.

O IFN- γ desempenha um papel fundamental na ativação da imunidade celular e, subsequentemente, na estimulação da resposta imune antitumoral, com base em suas funções citostáticas, pró-apoptóticas e antiproliferativas (Jorgovanovic *et al.*, 2020), essas funções, em grande parte, são coordenadas pela ligação do IFN- γ ao IFN γ R1/2 para ativar o transdutor de sinal Janus quinase (JAK) e a via da proteína de transcrição (STAT) (Ding *et al.*, 2022). Além disso, o IFN- γ pode amplificar o estresse oxidativo ao modular a atividade de enzimas antioxidantes, favorecendo a vulnerabilidade celular à ferroptose (Yu *et al.*, 2022).

A IL-17A é um mediador central da inflamação envolvido em todas as fases dos eventos inflamatórios. A atividade temporária e controlada da IL-17 faz parte da resposta imune fisiológica e da cicatrização do tecido, enquanto a atividade crônica da IL-17 induz respostas patológicas que promovem a autoimunidade e a oncogênese (Li *et al.*, 2019). O aumento de IL-17A também foi um achado relevante, visto que ela atua como um fator pró-inflamatório e também pode causar estresse oxidativo por meio da via NF- κ B (Li *et al.*, 2024), o que pode estar colaborando com o mecanismo de ferroptose. No entanto, sua relação direta com a ferroptose ainda é pouco explorada.

O aumento de IL-10 pode promover a proliferação e metástase de células tumorais por meio da imunossupressão, sendo considerada um marcador de prognóstico ruim em vários tipos de câncer (Elnaz *et al.*, 2018). No entanto, em nosso estudo, observamos uma redução nos níveis de IL-10, o que pode ter contribuído para um ambiente mais inflamatório. Isso é reforçado pelo aumento da expressão proteica de NF- κ B, uma vez que a IL-10 pode inibir sua translocação para o núcleo e, conseqüentemente, reduzir a sinalização inflamatória (Hamidullah; Changkija e Konwar, 2012).

Por outro lado, diferentemente do estudo de Yuan *et al.*, (2025), não observamos aumento significativo nos níveis de TNF- α , uma citocina habitualmente associada à ativação de NF-kB (Tang *et al.*, 2017). Uma possível explicação, é que a ativação de NF-kB tenha sido mais direcionada para a regulação de outras citocinas inflamatórias, como IL-6 e IFN- γ , no lugar de um efeito direto sobre TNF- α .

Um dos fatores essenciais que está relacionado a intensidade nos diferentes processos envolvidos na tumorigênese é o estresse oxidativo, definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e as defesas antioxidantes. O aumento da produção de ROS com o envelhecimento, tabagismo, obesidade e consumo de álcool, que são possíveis fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama, também apoiam seu envolvimento neste processo (Gurer *et al.*, 2018). A inflamação crônica induzida pelo estresse oxidativo leva a danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídios, que por sua vez contribuem para a desregulação de oncogênese e genes supressores de tumores, por exemplo, p53, BRCA2 e, finalmente, para o início e progressão do tumor (Mdkhana *et al.*, 2022; Schetter; Heegaard; Harris, 2010). O nível de estresse oxidativo pode ser examinado alternativamente pela quantidade de dano causado às proteínas, medindo a concentração de produtos proteicos de oxidação avançada (AOPPs). Os AOPPs são geralmente formados a partir de albuminas e polipeptídeos ricos em metionina ou tirosina como consequência de ataques de ROS (Sawicka *et al.*, 2020).

Nossos resultados mostram um aumento significativo na produção de AOPPs em doses maiores de L-arginina. Resultado esse, que pode ser de extrema importância quando utilizado em perspectivas clínicas, uma vez que, Delrieu e colaboradores descobriram que AOPPs plasmáticos são um fator favorável em pacientes com câncer de mama metastático submetidos a 6 meses de intervenção de atividade física. Pacientes com progressão do câncer ou que morreram durante o acompanhamento de 6 meses apresentaram concentrações significativamente menores de AOPPs. No entanto, uma redução na concentração de AOPP pode ter sido associada à elevada eficiência antioxidante induzida pela atividade física regular neste grupo (Delrieu *et al.*, 2021).

De forma geral, nossos dados indicam que o tratamento com L-arg contribuiu para a redução da viabilidade celular de células MDA-MB-231. A ausência de alvos específicos impulsiona a busca por novas estratégias terapêuticas. Nesse contexto, a L-arginina pode apresentar-se como uma potencial aliada na modulação das vias Nrf2 e NF- κ B. Contudo, ainda são necessários estudos adicionais para investigar diretamente a relação entre a ativação dessas vias e a ferroptose, bem como a possível regulação cruzada entre NF- κ B e Nrf2 nesse contexto.

7 CONCLUSÃO

O tratamento com L-arginina reduziu a viabilidade celular nas células MDA-MB-231 e aumentou a expressão proteica de Nrf2 e NF- κ B, sugerindo que o papel desses fatores de transcrição estão relacionados ao microambiente tumoral e à interação com outros reguladores celulares. Esses fatores podem atuar de maneira dual, tanto protegendo as células quanto induzindo processos citotóxicos, como a ferroptose. Houve também aumento dos níveis de IL-17A, IL-6, IL-2 e INF- γ , bem como na produção de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP). Esses eventos podem estar relacionados à ferroptose, sugerindo um possível mecanismo de morte celular induzido pela L-arg nesse modelo experimental. Dessa forma, esses achados, podem, pelo menos em parte, indicar que a L-arginina tem potencial como estratégia terapêutica no câncer de mama, especialmente no contexto de tumores agressivos como o TNBC. No entanto, são necessários avaliações adicionais, como avaliação da peroxidação lipídica, quantificação de ferro intracelular e análise do Sistema glutationa, para validar esses achados e melhor compreender os mecanismos envolvidos.

REFERÊNCIAS

AL-MUTAIRI, M. S.; HABASHY, H. O. Nuclear Factor- κ B Clinical Significance in Breast Cancer: An Immunohistochemical Study. **Medical Principles and Practice**, v. 32, n. 1, p. 33–39, 11 maio 2023.

ANANDHAN, A. et al. Breakdown of an Ironclad Defense System: The Critical Role of NRF2 in Mediating Ferroptosis. **Cell Chemical Biology**, v. 27, n. 4, p. 436–447, abr. 2020.

ANDRABI, S. M. et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. **Advanced Science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 10, n. 30, p. e2303259, 1 out. 2023.

B MDKHANA et al. Role of oxidative stress in angiogenesis and the therapeutic potential of antioxidants in breast cancer. **DOAJ (DOAJ: Directory of Open Access Journals)**, v. 26, n. 13, p. 4677–4692, 1 jul. 2022.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539–545, fev. 2001.

BAROUCH, L. A. et al. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. **Nature**, v. 416, n. 6878, p. 337–339, mar. 2002.

BARZAMAN, K. et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. **International Immunopharmacology**, v. 84, n. 106535, p. 106535, jul. 2020.

BEN-BARUCH, A. Host microenvironment in breast cancer development: Inflammatory cells, cytokines and chemokines in breast cancer progression: reciprocal tumor–microenvironment interactions. **Breast Cancer Research**, v. 5, n. 1, fev. 2002.

BIANCHINI, G. et al. Treatment landscape of triple-negative breast cancer — expanded options, evolving needs. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 19, n. 2, p. 91–113, 9 nov. 2021.

BŁASZCZAK, E. et al. Triple-Negative Breast Cancer Progression and Drug Resistance in the Context of Epithelial–Mesenchymal Transition. **Cancers**, v. 17, n. 2, p. 228, 12 jan. 2025.

BOVILLA, V. R. et al. Targeted Inhibition of Anti-Inflammatory Regulator Nrf2 Results in Breast Cancer Retardation In Vitro and In Vivo. **Biomedicines**, v. 9, n. 9, p. 1119–1119, 30 ago. 2021.

BRYANT, T. Remarks on Some Cases of Inflammation of the Breast Simulating Cancer. **British medical journal**, v. 2, n. 415, p. 608–9, dez. 1868.

BULLOCK, K. K.; RICHMOND, A. Beyond Anti-PD-1/PD-L1: Improving Immune Checkpoint Inhibitor Responses in Triple-Negative Breast Cancer. **Cancers**, v. 16, n. 12, p. 2189, nov. 2024.

CAILLEAU, R. et al. Breast tumor cell lines from pleural effusions. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 53, n. 3, p. 661–74, 1974.

CAO, Y. et al. L-Arginine supplementation inhibits the growth of breast cancer by enhancing innate and adaptive immune responses mediated by suppression of MDSCs in vivo. **BMC Cancer**, v. 16, 1 jun. 2016.

CHANDIMALI, N. et al. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. **Cell Death Discovery**, v. 11, n. 1, 24 jan. 2025.

CHEN, Y. et al. The interaction between ferroptosis and inflammatory signaling pathways. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 3, 21 mar. 2023.

CHEN, Y. et al. The interaction between ferroptosis and inflammatory signaling pathways. **Cell Death & Disease**, v. 14, n. 3, 21 mar. 2023.

CHOWDHRY, S. et al. Nrf2 is controlled by two distinct β -TrCP recognition motifs in its Neh6 domain, one of which can be modulated by GSK-3 activity. **Oncogene**, v. 32, n. 32, p. 3765–3781, 10 set. 2012.

CLOER, E. W. et al. NRF2 Activation in Cancer: From DNA to Protein. **Cancer Research**, v. 79, n. 5, p. 889–898, 13 fev. 2019.

COSTA, E. D. et al. Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 7, 2 jun. 2016.

DANFORTH, D. N. The Role of Chronic Inflammation in the Development of Breast Cancer. **Cancers**, v. 13, n. 15, p. 3918, 3 ago. 2021.

DELRIEU, L. et al. Impact of Physical Activity on Oxidative Stress Markers in Patients with Metastatic Breast Cancer. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2021, p. 6694594, Winter 2021.

DENARDO, D. G.; COUSSENS, L. M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 4, ago. 2007.

DENG, L. et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and relevance to inflammation. **Inflammation Research**, v. 72, n. 2, p. 281–299, 19 dez. 2022.

DERAKHSHAN, F.; REIS-FILHO, J. S. Pathogenesis of Triple-Negative Breast Cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 17, n. 1, p. 181–204, 24 jan. 2022.

DIVYA KESANAKURTI et al. Role of MMP-2 in the regulation of IL-6/Stat3 survival signaling via interaction with $\alpha 5\beta 1$ integrin in glioma. **Oncogene**, v. 32, n. 3, p. 327–340, 20 fev. 2012.

EGE ARZUK; GÜLİZ ARMAĞAN. Genistein and daidzein induce ferroptosis in MDA-MB-231 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 8 set. 2024.

ELNAZ SHEIKHPOUR et al. A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. **Reports of Biochemistry & Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 30, out. 2018.

FAN, Y.; HE, S. The Characteristics of Tumor Microenvironment in Triple Negative Breast Cancer. **Cancer Management and Research**, v. Volume 14, p. 1–17, jan. 2022.

FENG, Y. et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. **Genes & Diseases**, v. 5, n. 2, p. 77–106, jun. 2018.

FERRARI, P. et al. Molecular Mechanisms, Biomarkers and Emerging Therapies for Chemotherapy Resistant TNBC. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1665, 31 jan. 2022.

FIELD, C. J. The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. **The Journal of Nutrition**, v. 135, n. 1, p. 1–4, 1 jan. 2005.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829–37, 837a837d, 2012.

FURUKAWA, N. et al. The tumor microenvironment and triple-negative breast cancer aggressiveness: shedding light on mechanisms and targeting. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 26, n. 12, p. 1041–1056, 2 dez. 2022.

GAN, L. et al. Dual role of Nrf2 signaling in hepatocellular carcinoma: promoting development, immune evasion, and therapeutic challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 2 set. 2024.

GAO, W. et al. Dissecting the Crosstalk Between Nrf2 and NF- κ B Response Pathways in Drug-Induced Toxicity. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 2 fev. 2022.

GOENKA, A. et al. Tumor microenvironment signaling and therapeutics in cancer progression. **Cancer Communications**, v. 43, n. 5, 2 abr. 2023.

GRETEN, F. R.; GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. **Immunity**, v. 51, n. 1, p. 27–41, jul. 2019.

GUO, Q. et al. The Role of Iron in Cancer Progression. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 10 nov. 2021.

GURER-ORHAN, H. et al. The Role of Oxidative Stress Modulators in Breast Cancer. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 33, p. 4084–4101, 24 out. 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of cancer: the next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HE, F.; RU, X.; WEN, T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, 6 jul. 2020.

HUANG, R.; KANG, T.; CHEN, S. The role of tumor-associated macrophages in tumor immune evasion. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 150, n. 5, 7 maio 2024.

INGMAN, W. V. et al. Macrophages promote collagen fibrillogenesis around terminal end buds of the developing mammary gland. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 12, p. 3222–3229, dez. 2006.

JAHANI M;AZADBAKHT M;NOROOZNEZHAD F;MANSOURI K. L-arginine alters the effect of 5-fluorouracil on breast cancer cells in favor of apoptosis. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie**, v. 88, 2017.

JAHANI, M. et al. L-arginine/5-fluorouracil combination treatment approaches cells selectively: Rescuing endothelial cells while killing MDA-MB-468 breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 123, p. 399–411, jan. 2019.

JAIN, A.; BARGE, A.; PARRIS, C. N. Combination strategies with PARP inhibitors in BRCA-mutated triple-negative breast cancer: overcoming resistance mechanisms. **Oncogene**, 21 nov. 2024.

JARAMILLO, M. C.; ZHANG, D. D. The emerging role of the Nrf2-Keap1 signaling pathway in cancer. **Genes & Development**, v. 27, n. 20, p. 2179–2191, 15 out. 2013.

JING, S. et al. Levistilide a Induces Ferroptosis by Activating the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway in Breast Cancer Cells. **Drug design, development and therapy**, v. 16, p. 2981–2993, jul. 2022.

JORGOVANOVIC, D. et al. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. **Biomarker Research**, v. 8, n. 1, 29 set. 2020.

KARIHTALA, P. et al. Oxidative stress and counteracting mechanisms in hormone receptor positive, triple-negative and basal-like breast carcinomas. **BMC cancer**, v. 11, p. 262, Spring 2011.

KARIM, A. M. et al. Triple-negative breast cancer: epidemiology, molecular mechanisms, and modern vaccine-based treatment strategies. **Biochemical Pharmacology**, v. 212, p. 115545, 1 jun. 2023.

KASAI, S. et al. Regulation of Nrf2 by Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Physiology and Pathology. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 320, 17 fev. 2020.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress—implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutrition Research**, v. 34, n. 11, p. 907–929, nov. 2014.

KORDE CHOUDHARI, S. et al. Nitric oxide and cancer: a review. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 11, n. 1, 30 maio 2013.

KUDELA, E. et al. miRNA Expression Profiles in Luminal A Breast Cancer—Implications in Biology, Prognosis, and Prediction of Response to Hormonal Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 20, p. 7691, 17 out. 2020.

KUGA, A. et al. The β -TrCP-Mediated Pathway Cooperates with the Keap1-Mediated Pathway in Nrf2 Degradation *In Vivo*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 42, n. 7, 8 jun. 2022.

KUMAR, H. et al. Role of Nrf2 Signaling Cascade in Breast Cancer: Strategies and Treatment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 29 abr. 2022.

KUMAR, S.; SINGH, R. K.; BHARDWAJ, T. R. Therapeutic role of nitric oxide as emerging molecule. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 85, p. 182–201, jan. 2017.

LAWRENCE, T. The Nuclear Factor NF- B Pathway in Inflammation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 6, p. a001651–a001651, 7 out. 2009.

LEE, J.; ROH, J.-L. Targeting Nrf2 for ferroptosis-based therapy: Implications for overcoming ferroptosis evasion and therapy resistance in cancer. v. 1869, n. 7, p. 166788–166788, 1 out. 2023.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 7, p. 2750–2767, 1 jul. 2011.

LEHMANN, B. D. et al. Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0157368, 16 jun. 2016.

LEHMANN, B. D.; PIETENPOL, J. A. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. **The Journal of Pathology**, v. 232, n. 2, p. 142–150, 10 dez. 2013.

LEVILLAIN, O. Expression and function of arginine-producing and consuming-enzymes in the kidney. **Amino Acids**, v. 42, n. 4, p. 1237–1252, 13 maio 2011.

LI, S. et al. RSL3 Drives Ferroptosis through NF-κB Pathway Activation and GPX4 Depletion in Glioblastoma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, p. 2915019, 26 dez. 2021.

LI, X. et al. IL-17 receptor–based signaling and implications for disease. **Nature Immunology**, v. 20, n. 12, p. 1594–1602, 1 dez. 2019.

LI, Y. et al. Recent advances in therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 15, n. 1, 29 ago. 2022.

LIN, Z. et al. EGR1 Promotes Erastin-induced Ferroptosis Through Activating Nrf2-HMOX1 Signaling Pathway in Breast Cancer Cells. **Journal of Cancer**, v. 15, n. 14, p. 4577–4590, Winter 2024.

LINGAPPAN, K. NF-κB in oxidative stress. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 81–86, fev. 2018.

LIU, S. et al. Correlation between the Warburg effect and progression of triple-negative breast cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 27 jan. 2023.

LIU, T. et al. NF- κ B Signaling in Inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 2, n. 17023, 14 jul. 2017.

LIU, X. et al. Protein Phosphorylation in Cancer: Role of Nitric Oxide Signaling Pathway. **Biomolecules**, v. 11, n. 7, p. 1009, 10 jul. 2021.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E. Nitric oxide signaling in health and disease. **Cell**, v. 185, n. 16, p. 2853–2878, 4 ago. 2022.

MAKSYMOVA, L. et al. Nanobodies targeting the tumor microenvironment and their formulation as nanomedicines. **Molecular Cancer**, v. 24, n. 1, 4 mar. 2025.

MARTÍ I LÍNDEZ, A.-A.; REITH, W. Arginine-dependent immune responses. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 13, p. 5303–5324, 26 maio 2021.

mda-mb-231 - BCRJ. Disponível em: <<https://bcrcj.org.br/celula/mda-mb-231/>>.

MENEGON, S.; COLUMBANO, A.; GIORDANO, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 22, n. 7, p. 578–593, jul. 2016.

MENG, C. et al. Propofol induces proliferation partially via downregulation of p53 protein and promotes migration via activation of the Nrf2 pathway in human breast cancer cell line MDA-MB-231. **Oncology reports**, v. 37, n. 2, p. 841–848, fev. 2017.

MISHRA, D.; PATEL, V.; BANERJEE, D. Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cancers: Emphasis on Breast Cancer. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, v. 14, p. 117822341988268, jan. 2020.

MOI, P. et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 21, p. 9926–9930, 11 out. 1994.

MORGAN, M. J.; LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell Research**, v. 21, n. 1, p. 103–115, 28 dez. 2010.

NGO, V.; DUENNWALD, M. L. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2345, 27 nov. 2022.

NIOI, P. et al. The Carboxy-Terminal Neh3 Domain of Nrf2 Is Required for Transcriptional Activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 24, p. 10895–10906, 1 dez. 2005.

OTHMAN BENCHAMA et al. Inhibition of triple negative breast cancer-associated inflammation and progression by N- acylethanolamine acid amide hydrolase (NAAA). **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 23 dez. 2022.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, 2007.

PAL, S. K.; CHILDS, B. H.; PEGRAM, M. Triple negative breast cancer: unmet medical needs. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, n. 3, p. 627–636, 15 dez. 2010.

PAN, Y. et al. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 3 dez. 2020.

PARKER, J.S et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**. 2009.

PAVITRA, E. et al. The role of NF- κ B in breast cancer initiation, growth, metastasis, and resistance to chemotherapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 163, p. 114822, 1 jul. 2023.

PINNIX, Z. K. et al. Ferroportin and Iron Regulation in Breast Cancer Progression and Prognosis. **Science translational medicine**, v. 2, n. 43, p. 43ra56, 4 ago. 2010.

POLLARD, J. W. Trophic macrophages in development and disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 9, n. 4, p. 259–270, 1 abr. 2009.

QIN, J.-J. et al. Dual roles and therapeutic potential of Keap1-Nrf2 pathway in pancreatic cancer: a systematic review. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, 11 set. 2019.

RADA, P. et al. SCF/ -TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 6, p. 1121–1133, 18 jan. 2011.

RAKHA, E. A.; TSE, G. M.; QUINN, C. M. An update on the pathological classification of breast cancer. **Histopathology**, v. 82, n. 1, p. 5–16, 1 jan. 2023.

REED, J. R.; SCHWERTFEGER, K. L. Immune Cell Location and Function During Post-Natal Mammary Gland Development. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 3, p. 329–339, 24 ago. 2010.

ROSENBLUM, S. L. Inflammation, dysregulated iron metabolism, and cardiovascular disease. **Frontiers in aging**, v. 4, p. 1124178, mar. 2023.

SAHA, S. et al. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5474, 23 nov. 2020.

SANO, E. et al. Interleukin-6 sensitizes TNF- α and TRAIL/Apo2L dependent cell death through upregulation of death receptors in human cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1868, n. 7, p. 119037, 1 jun. 2021.

SARKAR, D.K et al. Role of NF- κ B as a Prognostic Marker in Breast Cancer : A Pilot Study in Indian Patients. **Indian J Surg Oncol**. Apr 25. 2013

SATOH, Y. et al. Supplementation of L-arginine boosts the therapeutic efficacy of anticancer chemoimmunotherapy. **Cancer science**, v. 111, n. 7, p. 2248–2258, jul. 2020.

SAWICKA, E. et al. Preliminary Study on Selected Markers of Oxidative Stress, Inflammation and Angiogenesis in Patients with Bladder Cancer. **Pathology & Oncology Research**, v. 26, n. 2, p. 821–831, 4 mar. 2019.

SCHETTER, A. J.; HEEGAARD, N. H. H.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 37–49, 1 jan. 2010.

SHAKYA, A. et al. Anti-Ferroptotic Effects of Nrf2: Beyond the Antioxidant Response. **Molecules and cells**, v. 46, n. 3, p. 165–175, 2023.

SINGH, R. et al. Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. **Cancer research**, v. 60, n. 12, p. 3305–12, Autumn 2000.

SOGHLI, N. et al. NRF2 signaling pathway: A comprehensive prognostic and gene expression profile analysis in breast cancer. **Pathology, research and practice**, v. 243, p. 154341, mar. 2023.

SONAR, S. A.; LAL, G. The iNOS Activity During an Immune Response Controls the CNS Pathology in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 4 abr. 2019.

STUEHR, D.; POU, S.; ROSEN, G. M. Oxygen Reduction by Nitric-oxide Synthases*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 18, p. 14533–14536, 1 jan. 2001.

SUKUMAR, J. et al. Triple-negative breast cancer: Promising prognostic biomarkers currently in development. **Expert Review of Anticancer Therapy**, v. 21, n. 2, 16 nov. 2020.

SUN, S.-C.; CHANG, J.-H.; JIN, J. Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 6, p. 282–289, jun. 2013.

SZEFEL, J.; DANIELAK, A.; KRUSZEWSKI, W. J. Metabolic pathways of L-arginine and therapeutic consequences in tumors. **Advances in Medical Sciences**, v. 64, n. 1, p. 104–110, mar. 2019.

TANG, D. et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications. **Cell Research**, v. 31, n. 2, p. 107–125, 2 dez. 2020.

TANG, D. et al. TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 23, p. 141–149, 7 abr. 2017.

TENOPOULOU, M.; DOULIAS, P.-T. Endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in the regulation of metabolism. **F1000Research**, v. 9, p. 1190, 1 out. 2020.

The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. **Redox Biology**, v. 1, n. 1, p. 45–49, 1 jan. 2013.

The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1415–1424, 1 dez. 2018.

TIAN, W. et al. Kelch-like ECH-associated protein 1 (KEAP1) differentially regulates nuclear factor erythroid-2-related factors 1 and 2 (NRF1 and NRF2). **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 6, p. 2029–2040, fev. 2018.

TONELLI, C.; CHIO, I. I. C.; TUVESON, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 29, n. 17, p. 1727–1745, 10 dez. 2018.

TONG, K. I. et al. Keap1 Recruits Neh2 through Binding to ETGE and DLG Motifs: Characterization of the Two-Site Molecular Recognition Model. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 8, p. 2887–2900, 15 abr. 2006.

UEDA, N.; TAKASAWA, K. Impact of Inflammation on Ferritin, Hepcidin and the Management of Iron Deficiency Anemia in Chronic Kidney Disease. **Nutrients**, v. 10, n. 9, p. 1173, 27 ago. 2018.

VARELA, M. L. et al. Acute Inflammation and Metabolism. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1115–1127, 5 fev. 2018.

VELICHKOVA, M.; HASSON, T. Keap1 Regulates the Oxidation-Sensitive Shuttling of Nrf2 into and out of the Nucleus via a Crm1-Dependent Nuclear Export Mechanism. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 11, p. 4501–4513, jun. 2005.

WAGNER, K.-U. Know thy cells: commonly used triple-negative human breast cancer cell lines carry mutations in RAS and effectors. **Breast Cancer Research**, v. 24, n. 1, 27 jun. 2022.

WANG, D.; DUBOIS, R. N. Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 10, p. 1085–1093, 8 set. 2015.

WANG, H. et al. RXR Inhibits the NRF2-ARE Signaling Pathway through a Direct Interaction with the Neh7 Domain of NRF2. **Cancer Research**, v. 73, n. 10, p. 3097–3108, 23 abr. 2013.

WANG, H. et al. RXR Inhibits the NRF2-ARE Signaling Pathway through a Direct Interaction with the Neh7 Domain of NRF2. **Cancer Research**, v. 73, n. 10, p. 3097–3108, 23 abr. 2013.

WANG, M. et al. Targeting inflammation as cancer therapy. **Journal of hematology & oncology**, v. 17, n. 1, 22 mar. 2024.

WANG, W.; NAG, S.; ZHANG, R. Targeting the NFκB Signaling Pathways for Breast Cancer Prevention and Therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 264–289, 8 dez. 2014.

WICKERT, A. et al. Inflammation in a ferroptotic environment. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 20 set. 2024.

WON, K.; SPRUCK, C. Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review). **International Journal of Oncology**, v. 57, n. 6, p. 1245–1261, 16 out. 2020.

WU, G. et al. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. **Amino Acids**, v. 37, n. 1, p. 153–168, 23 nov. 2008.

WU, X.; SUN, L.; XU, F. NF-κB in Cell Deaths, Therapeutic Resistance and Nanotherapy of Tumors: Recent Advances. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 6, p. 783–783, 24 maio 2023.

XIA, X. et al. NRF2/ABCB1-mediated efflux and PARP1-mediated dampening of DNA damage contribute to doxorubicin resistance in chronic hypoxic HepG2 cells. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 34, n. 1, p. 41–50, 28 out. 2019.

YAMAMOTO, M.; KENSLER, T. W.; MOTOHASHI, H. The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1169–1203, 1 jul. 2018.

YAN, N. et al. Dimethyl fumarate improves cognitive deficits in chronic cerebral hypoperfusion rats by alleviating inflammation, oxidative stress, and ferroptosis via NRF2/ARE/NF- κ B signal pathway. **International Immunopharmacology**, v. 98, p. 107844, set. 2021.

YAO, H. et al. L-arginine modified mesoporous bioactive glass with ROS scavenging and NO release for periodontitis treatment. **Bioactive Materials**, v. 48, p. 200–216, 19 fev. 2025.

YI, M. et al. Targeting cytokine and chemokine signaling pathways for cancer therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–48, 22 jul. 2024.

YIN, L. et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, 9 jun. 2020.

YIN, L. et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, n. 1, 9 jun. 2020.

YOON, D.-S. et al. Variable Levels of Chromosomal Instability and Mitotic Spindle Checkpoint Defects in Breast Cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 161, n. 2, p. 391–397, ago. 2002.

YOU, M. et al. Signaling pathways in cancer metabolism: mechanisms and therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, 10 maio 2023.

YUAN, J. et al. RSL3 induces ferroptosis by activating the NF- κ B signalling pathway to enhance the chemosensitivity of triple-negative breast cancer cells to paclitaxel. **Scientific Reports**, v. 15, n. 1, 11 jan. 2025.

ZHANG, C. et al. NRF2 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by increasing RhoA/ROCK pathway signal transduction. **Oncotarget**, v. 7, n. 45, 4 out. 2016.

ZHANG, H.; SUN, S.-C. NF- κ B in inflammation and renal diseases. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, 16 nov. 2015.

ZHANG, H.; SUN, S.-C. NF- κ B in inflammation and renal diseases. **Cell & Bioscience**, v. 5, n. 1, 16 nov. 2015.

ZHANG, H.-P. et al. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: an important driver and therapeutic target in triple-negative breast cancer. **Breast cancer**, 17 abr. 2024.

ZHANG, J. et al. Keap1-independent Nrf2 regulation: a novel therapeutic target for treating kidney disease. **Redox Biology**, p. 103593, 12 mar. 2025.

ZHANG, T. et al. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **MedComm**, v. 2, n. 4, 1 dez. 2021.

ZHAO, H. et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 12 jul. 2021.

ZHAO, S. et al. Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer. **Annals of Translational Medicine**, v. 8, n. 7, 1 abr. 2020.

ZHENG, H. et al. Tumor Microenvironment: Key Players in Triple Negative Breast Cancer Immunomodulation. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3357, 4 jul. 2021.

ZHU, G. et al. Inhibition of USP14 suppresses ferroptosis and inflammation in LPS-induced goat mammary epithelial cells through ubiquitylating the IL-6 protein. **Hereditas**, v. 159, n. 1, 12 maio 2022.

ZIMTA, A.-A. et al. The Role of Nrf2 Activity in Cancer Development and Progression. **Cancers**, v. 11, n. 11, 8 nov. 2019.

ZOU, S. et al. Arginine metabolism and deprivation in cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109210–109210, 19 jul. 2019.